Die Strukturen der „Kaffee-Atractyloside"

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hugo Obermann
aus Rosdorf-Rischenkrug
Kreis Göttingen

Göttingen 1976

Die Strukturen der „Kaffee-Atractyloside"

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hugo Obermann
aus Rosdorf-Rischenkrug
Kreis Göttingen

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. G. Spiteller

Korreferent: Professor Dr. U. Schöllkopf

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 4. 1976

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von August 1974 bis Januar 1976 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Spiteller durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. G. Spiteller, danke ich für die Aufgabenstellung und seine stete Bereitschaft, die mit dieser Arbeit verbundenen Probleme zu diskutieren.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534923_0002

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG 1

B. THEORETISCHER TEIL 4

I. Übersicht über bisher bekannte Diterpene in Kaffeebohnen 4

II. Isolierung der Glykoside des Atractyligenins 5

1. Extraktion und Verteilung 6

2. Chromatographie 8

III. Ermittlung der Struktur und Konfiguration von KA II (8) 10

IV. Ermittlung der Struktur und Konfiguration von KA I (7) 19

1. Bestimmung der Zuckerkomponenten 19

2. Bestimmung der Verknüpfungspunkte 23

3. Formeln der Derivate von 7 und 8 32

V. Synthese der Vergleichsverbindungen 34

1. Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11d) und Methyl-2,3,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11i) 34

2. Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e) 35

3. Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g) 36

VI. Diskussion der Massenspektren 37

VII. Abbildungen der IR- und NMR-Spektren 60

C. ZUSAMMENFASSUNG 62

D. EXPERIMENTELLER TEIL 66

I. Bestimmung der physikalischen Daten 66

II. Beschreibung der Aufarbeitungsverfahren 68

1) Extraktion und Verteilung 68

2) Trennung der glykosidischen Fraktionen 71

a) 1 kg Ansatz 71

b) 5 kg Ansatz (Arabica-Kaffee) 73

III. Derivatbildung und spektroskopische Daten 75

IV. Darstellung der Vergleichsverbindungen 92

1. Penta-O-trimethylsilyl-glucose (11b) 92

2. Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosid (11c) 92

3. Oktamethylcellobiose (12a) 93

4. Darstellung von Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e) 94

5. Darstellung von Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g) 97

LITERATURVERZEICHNIS 101

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Seite

Abbild. 1: Isolierung der Kaffee-Atractyloside 7

Gaschromatogramme:

Abbild. 2: Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von KA II (8) 11

3: Gaschromatogramm der Tetra-(trimethylsilyl)-methyl-glucoside (11c) 12

4: Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von Permethyl-KA II (8d) 15

5: Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von KA I (7) 22

6: Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von 9d 26

7: Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von 9d nach Trimethylsilylierung 26

8: Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von Permethyl-KA I (7d), (a) und nach Trimethylsilylierung, (b) 29

Seite

Massenspektren

Abbild. 9: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucosid (11d) 39

10: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucosid (11d) 39

11: Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e) 40

12: Methyl-2,3,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11i) 41

13: Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g) 43

14: Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-3-O-trimethylsilyl-α-D-glucopyranosid (11f) 45

15: Methyl-4,6-di-O-methyl-2,3-di-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosid (11h) 46

16: 2',3',4',6',15-Penta-O-methyl-2-O-ß-D-glucopyranosyl-atractyligeninmethyl-ester (8d) 48

Seite

Abbild. 17: 2',4',6',2",3",4",6",15-Octa-O-methyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethyl-ester)-ß-D-glucopyranosid (9d) 50

18: 4',6',2",3",4",6",15-Hepta-O-methyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethylester)-ß-D-glucopyranosid (7d) 52

19: 15-O-Methyl-atractyligenin-methylester (2c) 55

20: 15-O-Methyl-2-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester (2d) 56

21: 15-O-Methyl-16ß,17-dihydroatracty-ligeninmethylester 57

IR- und NMR-Spektren

Abbild. 22: IR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids I (7) 60

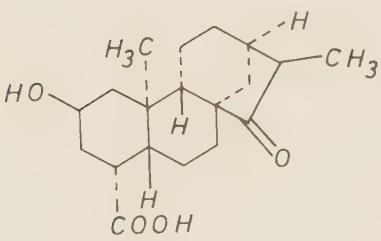
23: IR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids II (8) 60

24: NMR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids I (7) 61

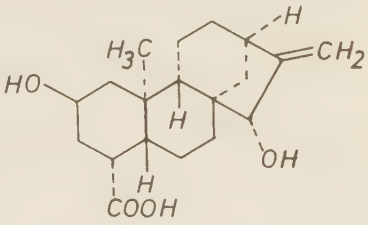
25: NMR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids II (8) 61

A. EINLEITUNG

Im Zuge von Untersuchungen über bisher unbekannte Ausscheidungsprodukte im Harn fanden wir kürzlich das 15-Keto-16,17-dihydroatractyligenin(1) [1]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß diese Verbindung ein Umwandlungsprodukt von Atractyligeninglykosiden ist. Diese Atractyligeninglykoside stammen aus Bohnenkaffee, was wir durch Nachweis von Atractyligenin (2) im Röst- und Rohkaffee sicherstellen konnten [2].



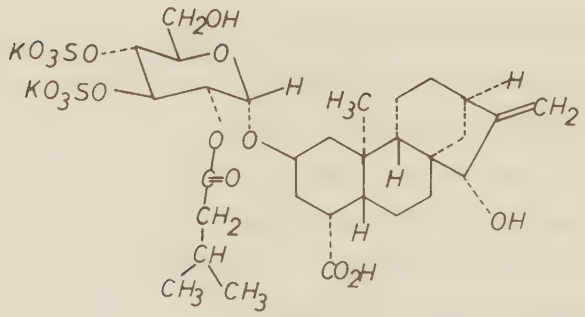
1



2

Atractyligenin war vorher nur als Bestandteil der auf Sizilien und in Nordafrika beheimateten Pflanze Atractylis gummifera L. (Mastix-Distel) bekannt geworden [3,4,5].

Es liegt in dieser Pflanze als Atractylosid vor [6].



3

Da das Atractylosid (3) (Glucosidderivat des Atractyligenins) beträchtliche physiologische Wirkung entfaltet [7,8], wurde es eingehend untersucht [9]. Nach Vignais [8] besteht die biochemische Hauptwirkung in der Hemmung der Nucleotidtranslocase in den Mitochondrien. 3 greift also in die Atmungskette ein und ist deshalb ein starkes Zellgift [9]. Auch das Atractyligenin (2), das zu 0,1 % im Röstkaffee enthalten ist [2], liegt als Glykosid vor. Man findet es im wasserlöslichen Kaffeeaufguß. Aus den wäßrigen Extrakten der Röstkaffeebohnen ist es nach enzymatischer Verseifung durch Enzyme aus Helix pomatia mit Ethylacetat extrahierbar [2].

Da der Bohnenkaffee in großen Mengen von der Bevölkerung

konsumiert wird, ist es von Interesse, die physiologische Wirkung des im Kaffee vorhandenen Glykosids von 2 zu kennen, zumal das Atractylosid (3) biochemisch wesentlich wirksamer ist als das Atractyligenin (2). Bei den pharmakologischen Untersuchungen mit Kaffeegetränken war bisher keine Atractylosidwirkung beobachtet worden. Daher war es erforderlich, die Glykoside des Atractyligenins (2) aus Kaffee zu isolieren und von den reinen Verbindungen die biochemische Wirksamkeit zu testen.

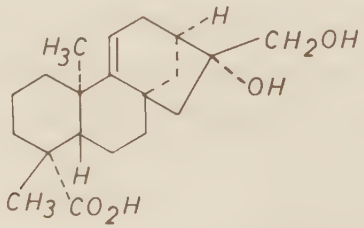
B. THEORETISCHER TEIL

I. Übersicht über bisher bekannte Diterpene aus Kaffeebohnen

Die glykosidischen Bestandteile der Kaffeebohnen von den für Röstzwecke verwendeten Sorten Coffea arabica und Coffea canephora (robusta) wurden bisher kaum untersucht.

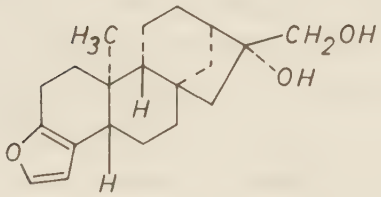
Lediglich aus Coffea buxifolia wurde das bitter schmeckende Glykosid Mascarosid [10] und aus Coffea Vianneyi Cafamarin [11] isoliert.

Aus Coffea arabica wurden von uns neben dem Atractyligenin eine Reihe weiterer Diterpene als Aglykone nach enzymatischer Spaltung erhalten. Einem von ihnen konnten wir die Struktur einer 16,17-Dihydroxy-(—)-9(11)-kauren-18-säure (4) zuschreiben [12].

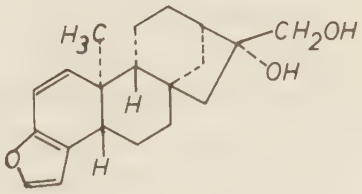


4

Vorher waren nur die Diterpene vom Kaurantyp Cafestol (5)[13-16] und Kahweol (6)[17-19] als Kaffeeinhaltsstoffe bekannt, die als Fettsäureester vorkommen und deshalb kaum wasserlöslich sind.



5



6

II. Isolierung der Glykoside des Atractyligenins

Bei der Isolierung und Reindarstellung von Glykosiden wird häufig folgender Weg beschritten:[20,21]

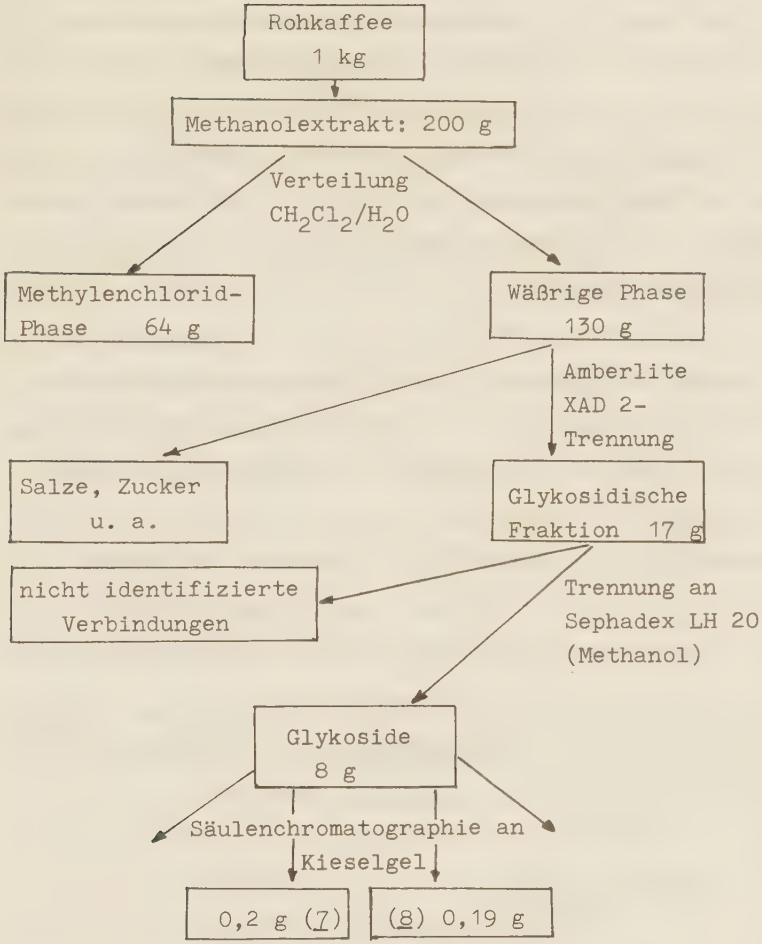
Das Pflanzenmaterial wird mit Gemischen von Wasser und Alkohol (Methyl- oder Ethylalkohol) extrahiert und nach dem Eindampfen im Vakuum durch Kristallisations- oder Chromatographieschritte rein dargestellt. Dieser Weg hätte bei der Isolierung von Glykosiden aus Kaffee schwerlich zum Erfolg geführt, denn Röstkaffee läßt sich zwar gut mit

Wasser extrahieren, aber durch den Röstprozeß wird die Zahl der vorhandenen Substanzen infolge von Pyrolysen vervielfacht [22]. Man hätte also nicht feststellen können, welche Stoffe tatsächlich vor dem Röstprozeß vorgelegen hatten und welche danach entstanden waren. Andererseits lassen sich grüne Kaffeebohnen wegen des hohen Fettgehalts schlecht mit Wasser extrahieren [22]. Als Lösungsmittel, das hervorragende Lösungseigenschaften sowohl für Lipide als auch für polare Verbindungen besitzt, bietet sich Methanol an, das deshalb für die Extraktion verwendet wurde.

1. Extraktion und Verteilung

Fein gemahlener Rohkaffee * wurde im Soxhlet erschöpfend mit Methanol extrahiert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Den Rückstand verteilte man zur Entfernung der Lipide zwischen Wasser und Methylenchlorid: Die wäßrige Phase, die die Glykoside enthalten mußte, wurde bei einem Ansatz zur weiteren Reinigung mit Ethylacetat extrahiert.

* Den gemahlenen Rohkaffee stellte Herr Dr. O. Vitzthum von der HAG AG, Bremen zur Verfügung.



Weitere Reinigung durch DC, Gelfiltration
und Kristallisation

Abb. 1 Isolierung der Kaffee-Atractyloside

Zur Entfernung der organischen Lösungsmittelreste aus der wäßrigen Phase des Kaffee-Extraktes erhitzte man auf 40° C und leitete unter starkem Rühren einen Stickstoffstrom über die Lösung. Reste von organischen Lösungsmitteln stören nämlich das Adsorptionsgleichgewicht an der folgenden Amberlite XAD 2-Adsorption empfindlich und müssen deshalb vorher entfernt werden.

Zur schonenden Anreicherung der Glykoside wurde das bei der Isolierung von Steroidglucuroniden bewährte Verfahren der Amberlite XAD 2-Extraktion [23] angewandt. XAD 2 ist ein neutrales Polymer, das Lipide und Glykoside aus wäßrigen Lösungen adsorbiert. Zur Adsorption der Glykoside an Amberlite XAD 2 wurde die abgekühlte wäßrige Lösung über eine mit dem Adsorptionsmaterial gefüllten Säule gegeben und mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Die Elution erfolgte - nach dem Trockensaugen des Adsorbens an der Wasserstrahlpumpe - mit Methanol.

2. Chromatographie

Die methanolische Lösung dampfte man am Rotationsverdampfer ein, nahm den Rückstand in wenig Methanol wieder auf und chromatographierte zur Trennung nach der Molekülgröße an Sephadex LH 20. Als Elutionsmittel diente Methanol. Zur Auffindung der atractyligeninhaltigen Verbindungen

wurde von den einzelnen Fraktionen ein Aliquot nach dem Eindampfen und Trocknen im Vakuum einer enzymatischen Spaltung mit Enzymen aus Helix pomatia unterworfen [1,2].

Die Spaltprodukte konnten mit Ethylacetat extrahiert werden. Da das Atractyligenin (2) eine Carboxylgruppe besitzt, trennte man mittels Natronlauge die Säuren ab und extrahierte nach dem Ansäuern durch Eisessig erneut mit Ethylacetat. Die eingeengten Ethylacetat-Extrakte veresterte man mit Diazomethan und analysierte in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer. Die vereinigten atractyligeninhaltigen Fraktionen trennte man an einer Kieselgelsäule mit den folgenden Laufmitteln: 1. Chloroform, 2. Chloroform mit 5 % Methanol, 3. Chloroform mit 10 % Methanol und 4. Chloroform-Methanol-Wasser im Volumenverhältnis von 65: 30:5.

Von den einzelnen Fraktionen wurden wieder kleine Mengen enzymatisch gespalten und nach Diazomethanbehandlung in der GC-MS-Kombination untersucht. In zwei Fraktionen, die sich mit dem Laufmittel 4 von der Säule eluieren ließen, konnte Atractyligenin (2) nachgewiesen werden. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Säulenfraktion zeigte, daß die beiden atractyligeninhaltigen Fraktionen ein unterschiedliches Fleckenmuster aufwiesen. Beide Fraktionen ergaben auf der Dünnschichtplatte mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens leuchtend rote Flecken, die auch für freies

Atractyligenin (2) charakteristisch sind. Die geringfügigen Unterschiede in den Rf-Werten der roten Flecken wiesen jedoch daraufhin, daß im Kaffee mindestens zwei Glykoside des Atractyligenins (2) vorliegen sollten. Zur weiteren Reinigung wurden die beiden glykosidischen Atractyligeninfraktionen erst an präparativen Dünnschichtplatten mit dem Elutionsmittel 4, dann an Sephadex LH 20 mit Chloroform-Methanol 75:25 getrennt. Die Umkristallisation aus Methanol ergab 200 mg KA I (7) (Kaffee-Atractylosid I) und 190 mg KA II (8) je kg Bohnen von Coffea arabica. KA I (7) ist die unpolarere Verbindung.

III. Ermittlung der Struktur und Konfiguration von KA II (8)

Die Molekulargewichtsbestimmung durch Messung des osmotischen Drucks ergab ein Molekulargewicht von 475 ± 23. Das Felddesorptionsmassenspektrum (FD) zeigte Spitzen bei m/e 484 (M^+), 466 (M^+-H_2O), 448(M^+-2H_2O), 320 und 302 (M^+-180).

Der Verlust eines 180 Masseneinheiten schweren Teilchens wies auf das Vorliegen eines C_6-Zuckers hin. Die C-H-Analyse ergab die Bruttoformel $C_{25}H_{38}O_9$. Zur Bestätigung der Annahme, daß 8 einen C_6-Zucker enthielt, wurde die Ver-

bindung mit methanolischer Salzsäure gespalten. Die Spaltprodukte wurden mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid silyliert und in der Kombination GC-MS untersucht. Das Gaschromatogramm (Abb. 2)zeigt drei Hauptpeaks. Das Massenspektrum (MS) von Peak 1 ist identisch mit dem des Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-ß-D-glucopyranosids (11c), Peak 2 ergab das MS von Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-α-D-glucopyranosid (11c), das MS von Peak 3 zeigt ein Gemischspektrum von 2,15-Di-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester (2b) und umgelagerten Produkten: 15-O-Methyl-2-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester und andere Verbindungen, die wahrscheinlich nicht mehr das Kaurangerüst haben.

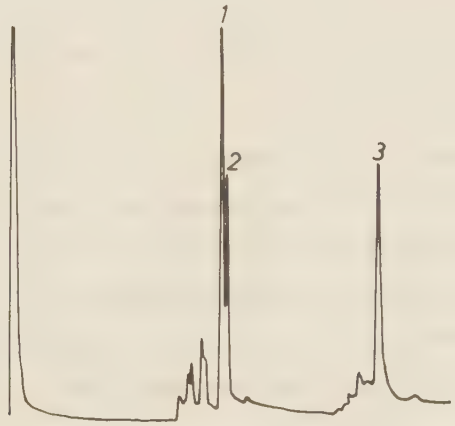


Abb. 2 Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von KA II (8)

D-Glucose ergibt unter den Solvolysebedingungen, die zur Spaltung von 8 angewandt wurden, nach Trimethylsilylierung das in Abb. 3 gezeigte Gaschromatogramm. Die Retentionszeiten und die Massenspektren sind identisch mit denen der Zuckerkomponenten, die durch Solvolyse von 8 nach Trimethylsilylierung erhalten wurden.

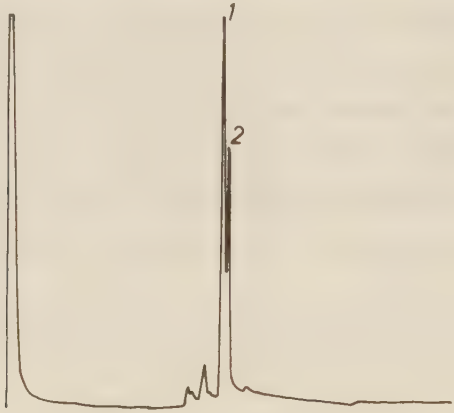


Abb. 3 Gaschromatogramm der Tetra-(trimethylsilyl)-methyl-glucoside (11c)

KA II (8) besteht also aus einem Mol Glucose und einem Mol Atractyligenin. Für die Verknüpfung des Atractyligenins mit der Glucose ergeben sich 3 Möglichkeiten:

1. an der Carboxylgruppe als Esterglucosid,
2. an der 2-ständigen OH-Gruppe als O-Glucosid und
3. an der 15-ständigen OH-Gruppe ebenfalls als O-Glucosid.

Zur Ermittlung der Verknüpfung wurde KA II (8) acetyliert. Nach Aussage des NMR-Spektrums entstand ein Penta-acetat (8a).

Das NMR-Spektrum des KA II-Peracetats (8a) zeigt 5 Acetylgruppen bei δ 1,96 - 2,06 ppm. 4 Acetylgruppen müssen am Glucoserest gebunden sein, für das Atractyligeninmolekül bleibt nur noch eine Acetylgruppe übrig. Also muß der Glucosidrest an einer der beiden OH-Gruppen des Atractyligenins (2) sitzen.

Zur Bestätigung, daß die Carboxylgruppe des Atractyligeninrestes frei ist, wurde aus KA II (8) mit Diazomethan der KA II-Methylester (8b) dargestellt. Das NMR-Spektrum des KA II-Methylesters (8b) zeigt ein 3-Protonensingulett bei δ 3,58 ppm (CO_2CH_3). Der Methylester 8b wurde zu 8c peracetyliert. Das NMR-Spektrum von 8c bestätigt das Vorliegen eines Glucosids. Die Acetylsignale bei δ 1,96 - 2,07 ppm weisen auf eine alläquatoriale Stellung der Acetylgruppen hin, dies ist nur bei der Sesselform eines D-Glucopyranosids der Fall [24]. Aus dem Dublett bei δ 4,63 ppm mit einer Kopplungskonstante von J=8,5 Hz (Kopplung eines axialen mit einem axialen Proton) geht die ß-glucosidische Verknüpfung hervor, α-Glucoside haben eine Kopplungskonstante von 3,5 - 5 Hz [6,24,25] (axial-äquatoriale Kopplung). Die ß-Konfiguration des glykosidischen C-Atoms ergibt sich auch aus der leichten Spaltbarkeit von KA II mit ß-Glucosidase, während es durch α-Glucosidase nicht gespalten wird.

Eine Entscheidung, welche der beiden OH-Gruppen des Atractyligenins (2) die Glucosidfunktion trägt, ist aus dem

NMR-Spektrum nicht möglich, da beide OH-Gruppen quasi äquatorial stehen. Deshalb wurde der KA II-Methylester (8b) mit Silberoxid und Methyljodid permethyliert. Das Massenspektrum von Permethyl-KA II (8d) (Abb.16 , Seite 48) zeigt das erwartete Molekülion m/e 566 und charakteristische Ionen bei m/e 331 (M^+-Permethylglucosidradikal) und m/e 98. Das NMR-Spektrum von Permethyl-KA II (8d) ist charakterisiert durch die Signale der 5 Methoxyl- und der einen Methylestergruppe bei δ 3,37 - 3,60 und 3,64 ppm. 8d wurde mit 5 %iger methanolischer Salzsäure bei 90° C gespalten und die Spaltprodukte in der GC-MS-Kombination analysiert.

Das Gaschromatogramm (Abb. 4) besteht aus 3 Hauptpeaks: Peak 1 und Peak 2 entsprechen nach ihren Massenspektren ß- und α-Methyl-2,3,4,6-tetramethyl-D-Glucopyranosid (11d), Peak 3 ist nach Aussage des Massenspektrums 2-oder 15-O-Methyl-Atractyligeninmethylester (2c).

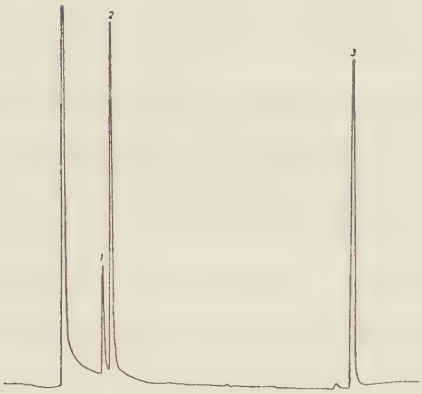
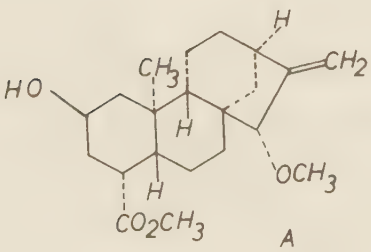
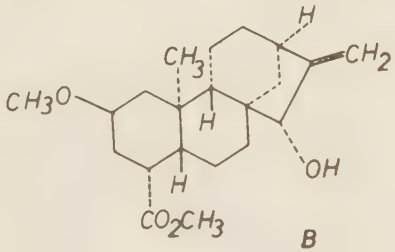


Abb. 4 Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von Permethyl-KA II (8d)

2c konnte Struktur A oder B haben.



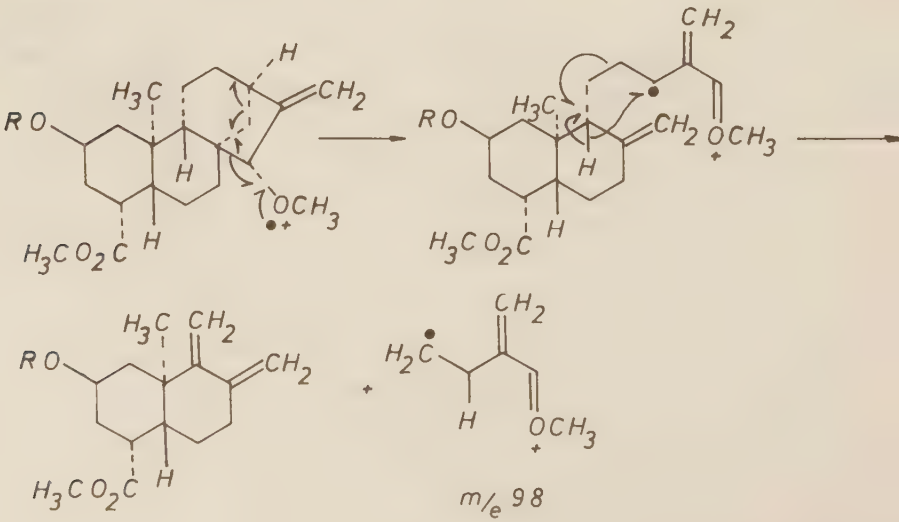
A



B

2c

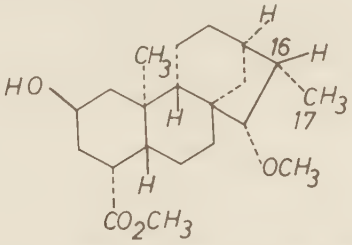
Eine Zuordnung der Struktur gelingt leicht durch die Auswertung des Massenspektrums von 2c (Abb. 19, Seite 59), das durch ein intensives Bruchstück bei der Masse 98 gekennzeichnet ist. Die hochauflösende Massenspektrometrie ergab für m/e 98 die Bruttoformel $C_6H_{10}O$. Im Massenspektrum des Atractyligenin-methylesters (2a) tritt kein Bruchstück der Masse 98 auf. Es wird auch kein Spaltstück bei m/e 84 beobachtet, wie man es wegen der Differenz von 14 Masseneinheiten beim Übergang von $OCH_3 \rightarrow OH$ erwarten könnte. Das Fragment m/e 98 wird also bevorzugt unter dem Einfluß der Methoxylgruppe gebildet. Daher muß es die OCH_3-Gruppe und 5 Nachbaratome enthalten, zumal die Ionisierungswahrscheinlichkeit an der OCH_3-Gruppe sehr groß ist [26]. Die Bildung eines Spaltstückes mit 6 C-Atomen und nur einem Sauerstoffatom aus dem A-Ring ist unwahrscheinlich. Aus dem C und D-Ring kann dieses Fragment aber wie folgt entstehen:



Die Methoxy-Gruppe ist also in Stellung 15 zu lokalisieren.

Wäre die Methoxylgruppe 2-ständig und das Spaltstück der Masse 98 aus dem Ring A entstanden, so hätte eine Hydrierung der Doppelbindung an dem Auftreten des Spaltstückes nichts ändern dürfen.

Das Massenspektrum der hydrierten Verbindung (10) zeigt den Peak bei m/e 98 nicht. Auch eine Verschiebung zu einem Bruchstück der Masse 100 erfolgte nicht, weil sich das Ion m/e 98 offenbar nur unter dem Einfluß der stabilisierenden Doppelbindung bildet.



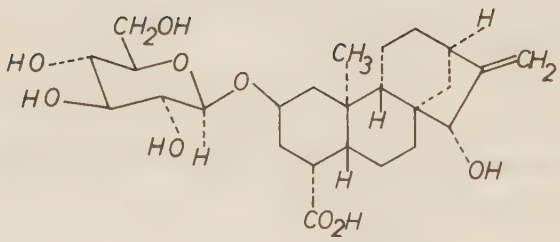
10 *

---

* Die Stereochemie an 16 wurde aufgrund von Modellbetrachtungen und folgenden Beobachtungen festgelegt: Da im Gaschromatogramm nur ein Peak erscheint, ist wahrscheinlich bei der katalytischen Hydrierung nur eines der beiden möglichen Isomeren entstanden. Durch die raumerfüllende OCH_3-Gruppe ist ein Angriff des Wasserstoff-Katalysator-Komplexes nur von der ß-Seite möglich.

Für die Verbindung 2c steht somit eindeutig die Struktur A fest.

Damit kann man KA II (8) die Konfiguration einer 2ß-(ß-D-Glucopyranosidoxy)-15α-hydroxy-19-nor-(—)-16-kauren-18-säure = 2-O-ß-D-Glucopyranosyl-atractyligenin zuschreiben.



8

IV. Ermittlung der Struktur und Konfiguration von KA I (7)

1. Bestimmung der Zuckerkomponenten

Die Molekulargewichtsbestimmung von KA I (7) (durch Messung des osmotischen Drucks) liefert einen Wert von 697 ± 35. Das FD-Massenspektrum zeigt einen einzigen Peak bei m/e 751.

Das Molekulargewicht kann allerdings nicht 751 betragen. In Felddesorptionsmassenspektren beobachtet man häufig Spitzen, die ein höheres Molekulargewicht vortäuschen, meistens handelt es sich um M^+ + H- oder M^++ Na-Peaks [27,28]. Nimmt man für m/e 751 ein M^+ + H-Ion an, dann liegt das aus dem osmotischen Druck berechnete Molekulargewicht zu tief. Ein Molekulargewicht (MG) von 728, wie es das Ion als M^+ + Na anzeigt, liegt aber innerhalb der Fehlergrenze der Molekulargewichtsbestimmung mittels Osmose. Aus der C-H-Analyse läßt sich unter Zugrundelegung des MG von 728 die Bruttoformel $C_{36}H_{56}O_{15}$ berechnen.

Das IR-Spektrum von KA I (7) zeigt neben der C=O-Bande der Carboxylgruppe des Atractyligeninrestes bei 1715 cm^{-1} eine zweite C=O-Bande bei 1735 cm^{-1}. Demnach sollte es sich bei dieser C=O-Bande um eine Estergruppierung handeln.

Da Estergruppen im alkalischen Medium leicht hydrolisierbar sind, wurde KA I (7) verseift. Die Behandlung von KA I (7) mit methanolischer Natronlauge bei Zimmertemperatur lieferte ein Spaltprodukt KA I a (9), das auf der Dünnschichtplatte einen niedrigeren Rf-Wert hat als KA I (7). Das FD-Massenspektrum von KA I a (9) ist durch einen einzigen Peak bei m/e 667 gekennzeichnet, der einem M^+ + Na-Ion entspricht. Das Molekulargewicht von KA I a beträgt also 644.

Zur Isolierung des zweiten Spaltproduktes von KA I (7) wurde die alkalische Reaktionslösung an einem Amberlite Amberlyst-15-Kationenaustauscher neutralisiert und mit Diethyläther eine Verbindung extrahiert, deren Massenspektrum mit dem der Isovaleriansäure identisch ist. Die Isovaleriansäure wurde auch durch das Massenspektrum des Methylesters und durch ihr IR-Spektrum charakterisiert.

Im NMR-Spektrum von KA I (7) liegen die Signale der 10α-CH_3-Gruppe des Atractyligenins und die CH_3-Signale der Isovalerianestergruppe übereinander. Um eine sichere Auswertung zu gewährleisten, veresterte man KA I (7) mit Diazomethan und nahm vom KA I-Methylester (7a) ein NMR-Spektrum auf. Hier treten die 10α-CH_3-Protonen bei δ 0,88 ppm (s) und die Methylprotonen des Isovaleriansäureesters bei δ 0,98 ppm als doppeltes Dublett mit J=7 und 1,5 Hz in Resonanz. Das Integral der Methylprotonen läßt sich exakt auswerten und bestätigt das Vorliegen von einem

Mol Isovaleriansäure im KA I-Molekül.

Zur Untersuchung der Zuckerkomponenten wurde KA I (7) mit methanolischer Salzsäure hydrolisiert. Nach dem Entsäuern an einem Amberlite Amberlyst A-21 -Anionenaustauscher und Eindampfen am Rotationsverdampfer silylierte man mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid und analysierte in der GC-MS-Kombination. Das Gaschromatogramm (Abb. 5) zeigte 3 Spaltprodukte an. Nach Aussage der Massenspektren handelte es sich bei den beiden Verbindungen mit den niedrigeren Retentionszeiten um ß- und α-Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-D-glucopyranosid (11c), bei dem Peak mit der höheren Retentionszeit um 2,15-Di-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester (2b) und umgelagerte Produkte.

Bei der Solvolyse mit methanolischer Salzsäure wird also die Carboxylgruppe des Atractyligenins verestert, der ebenfalls entstehende Isovaleriansäureester geht beim Eindampfen verloren.

Ein Vergleich der Gaschromatogramme der silylierten Hydrolyseprodukte von KA I (7) mit denen von KA II (8) zeigt, daß die Persilyl-methyl-glucosid-Peaks im Verhältnis zum Aglykon bei KA I (7) doppelt so hoch sind wie bei KA II (8).

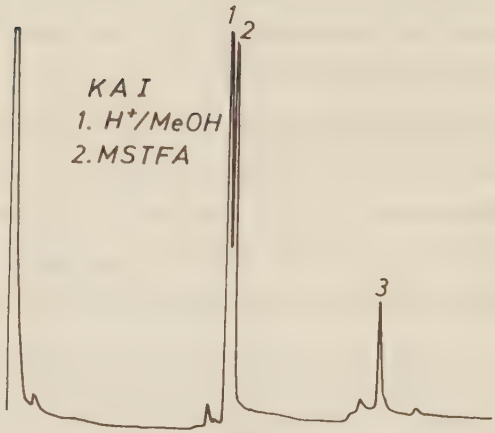
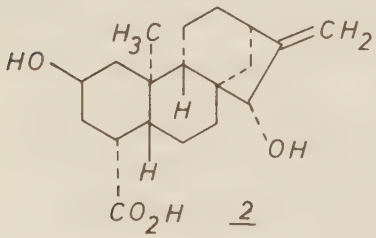
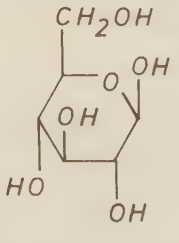


Abb. 5 Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von KA I (7)

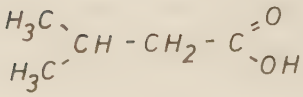
KA I (7) besteht also aus 1 Molekül Atractyligenin (2), 2 Molekülen Glucose (11) und 1 Molekül Isovaleriansäure.



2



11



Aus den beiden Dubletts bei δ 4,90 und 5,07 ppm im NMR-Spektrum von KA I (7) und den Dubletts bei δ 5,08 und 5,13 ppm im NMR-Spektrum von KA I a (9) mit einer Kopplungskonstante von je 8,5 Hz ist ersichtlich, daß beide Moleküle Glucose ß-glucosidisch verknüpft sein müssen. Die Isovaleriansäure ist als Ester gebunden, was durch die Carbonylbande bei 1735 cm^{-1} im IR-Spektrum von KA I (7) angezeigt und durch die Bildung von KA I a (9) bei der alkalischen Hydrolyse bestätigt wird.

2. Bestimmung der Verknüpfungspunkte

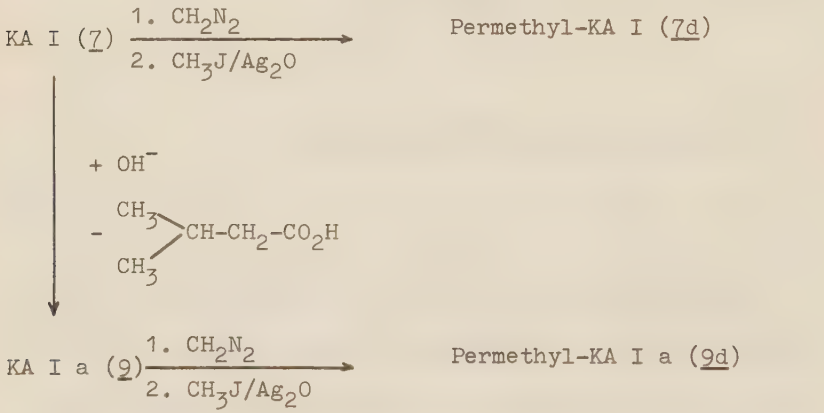
Die Carboxylgruppe des Atractyligenins (1) ist frei, da KA I (7) sich mit Diazomethan zum KA I-Methylester (7b) umsetzen läßt. Je ein Glucoserest kann entweder am 2-O-Atom und am 15-O-Atom des Atractyligenins gebunden sein oder die beiden Glucosereste sind aneinander gebunden und das Diglucosid hängt entweder an C-2 oder C-15 des Atractyligenins.

Glu-C-Atractyligenin-C-Glu
2 15

Glu-Glu-C-Atractyligenin-C-OH
2 15

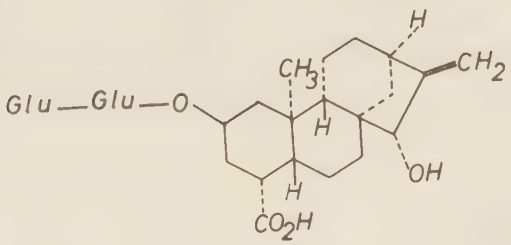
HO-C-Atractyligenin-C-Glu-Glu
2 15

Das NMR-Spektrum von KA I (7) zeigt an einem 1-Protonen-Multiplett bei δ 5,45 ppm, daß die Isovaleriansäure mit dem 2,3 oder 4-O des einen Glucoserestes verknüpft sein muß. In diesem Bereich treten sonst nur die 2,3 und 4-O-C-H-Protonen von Acetylzuckern in Resonanz [27]. Zur Klärung der Konfiguration von KA I (7) wurden der KA I-Methylester (7b) und der KA I a-Methylester 9b mit Methyljodid und Silberoxid permethyliert.



Das Massenspektrum von Permethyl-KA I a (9d) zeigt das erwartete Molekülion der Masse 770 mit der Bruttoformel $C_{40}H_{66}O_{14}$, die durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelt wurde. An dem Ion der Masse 98 ist ersichtlich, wie schon bei der Besprechung der Struktur von Permethyl-KA II ausgeführt, daß das C-Atom 15 des Atractyligenins von Permethyl-KA I a (9d) eine OCH_3-Gruppe trägt. Die 15-OH-

Gruppe liegt im Molekül von KA I a (9) frei vor. Demzufolge müssen die Glucosereste als Kette mit dem 2-O-Atom des Aglykons verknüpft sein.



Permethyl-KA I a (9d) wurde einer sauren Spaltung mit methanolischer Salzsäure unterworfen und die Spaltprodukte in der GC-MS-Kombination analysiert: Das Gaschromatogramm (Abb. 6) besteht aus 4 Hauptpeaks A, B, C, D. A und B ergeben die Massenspektren von ß- und α-Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosid (11d), D das MS von 15-O-Methyl-atractyligenin-methylester (2c), C das MS eines Methyl-tri-O-methyl-glucosids (11e). Die Stellung der freien OH-Gruppe, dem Verknüpfungspunkt mit dem zweiten Glucosemolekül, läßt sich aus diesem Massenspektrum nicht bestimmen. Aus dem intensiven Ion der Masse 45 ($CH_2=\overset{+}{O}-CH_3$) läßt sich lediglich ableiten, daß das C-Atom 6 des teilmethylierten Glucosemoleküls nicht die freie OH-Gruppe trägt. Die Stellung

2 scheidet ebenfalls als Träger der OH-Gruppe aus, da das Massenspektrum dieser Verbindung in der Literatur [29] beschrieben wurde und nicht identisch ist mit dem MS des Solvolyseproduktes (11e).

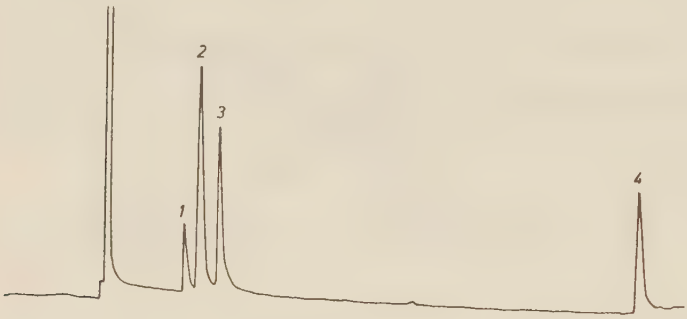


Abb. 6 Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von 9d

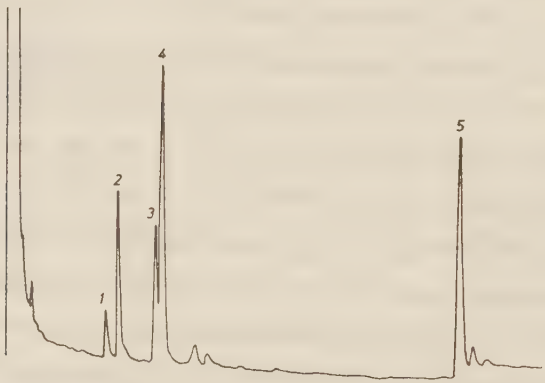
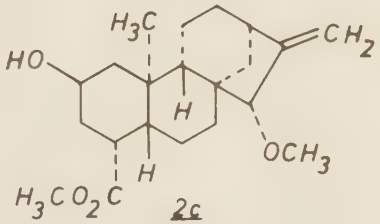
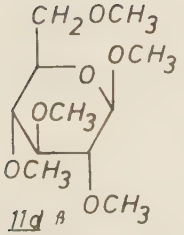


Abb. 7 Gaschromatogramm der Solvolyseprodukte von 9d nach Trimethylsilylierung

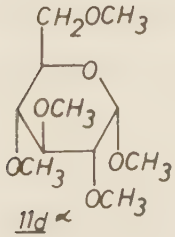
Die verbleibenden Methyl-tri-O-methylglucoside mit einer OH-Gruppe in Stellung 3 bzw. in 4 wurden synthetisiert. Das MS des Methyltrimethylglucosids, das bei der sauren Hydrolyse von Permethyl-KA I a (9d) entsteht, ist identisch mit dem MS von α,ß-Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-glucopyranosid (11e) und verschieden vom 4-OH-Isomeren (11i). Die Massenspektren der Trimethylsilylderivate untermauern diesen Befund.

Permethyl KA I a (9d) $\xrightarrow{CH_3OH/H^+}$ 

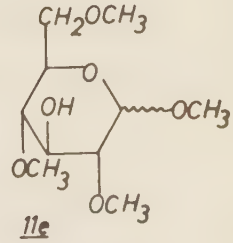
2c +



11d ß +

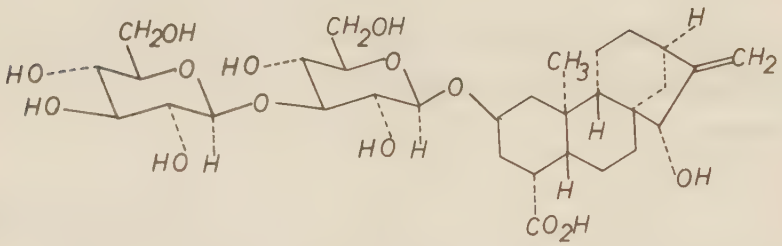


11d ∝ +



11e

Daher besitzt KA I a (9) die Konfiguration eines 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-ß-D-glucopyranosids.



9

KA I (7) enthält zusätzlich 1 Molekül Isovaleriansäure. Eine erste Auskunft über die Stellung der Isovaleriansäure gibt das Massenspektrum von Permethyl-KA I (7d) (Abb.18, Seite 52) mit dem M^+ bei 840 und der Bruttoformel $C_{44}H_{72}O_{15}$, die durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt wurde.

Aus dem Bruchstück der Masse 605, das dem Verlust eines Tetramethylglucose-Radikals entspricht, läßt sich schließen, daß die Isovaleroylgruppe mit dem direkt am Atractyligenin (2) gebundenen Glucosidrest verknüpft ist. Bestätigt wird diese Schlußfolgerung durch ein Spaltstück bei m/e 257 ($C_{13}H_{21}O_5$, Hochauflösung), das den mittleren Teil des Permethyl-KA I-Moleküls darstellt und noch den Isovaleroylrest enthält.

Die Analyse der sauren Spaltprodukte von Permethyl-KA I (7d) liefert wie erwartet ß- und α-Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosid 11d, 15-O-Methylatractyligenin-methylester (2c) und ein Methyldimethylglucosid (11g). Der ebenfalls entstandene Isovaleriansäureester konnte nicht nachgewiesen werden, weil er beim Eindampfen mit dem Lösungsmittel entweicht.

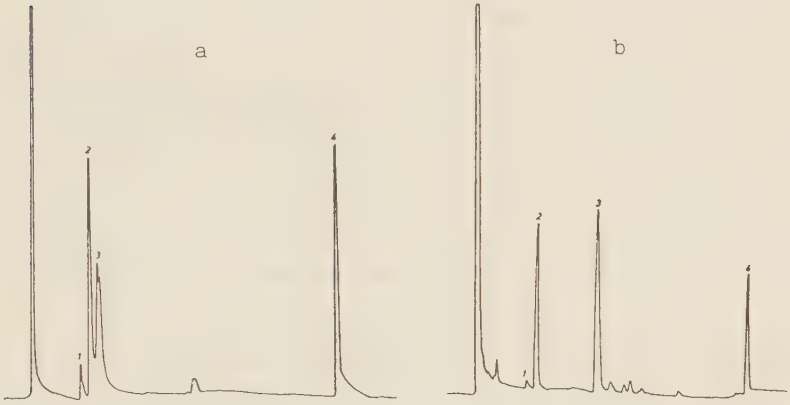
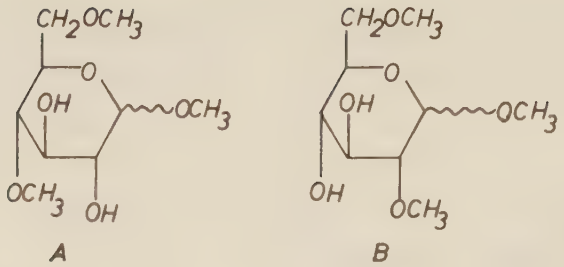


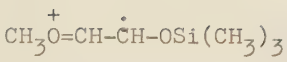
Abb. 8 Gaschromatogramme der Solvolyseprodukte von Permethyl-KA I (7d), (a) und nach Trimethylsilylierung, (b)

Das Massenspektrum des Methyl-dimethylglucosids (11g) ist durch ein intensives Bruchstück der Masse 45 gekennzeichnet, das der Struktur $CH_2=\overset{+}{O}-CH_3$ entspricht. Dieses Spaltstück muß das C-Atom 6 enthalten. Aus diesen Befunden und aus der Struktur von KA I a (9) geht hervor, daß 11g entweder Struktur A oder B haben muß.

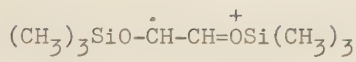


11g

Besser auswertbare Massenspektren erhielt man nach der Trimethylsilylierung der Spaltprodukte. Methylierte und trimethylsilylierte Pyranosen zerbrechen vorzugsweise unter Bildung von 2-Kohlenstoff-Bruchstücken. Im Massenspektrum der permethylierten Glucose beträgt die Intensität des m/e 88-Ions 100 % [29]. Dieses Bruchstück hat die Struktur: $CH_3\text{-}\overset{+}{O}\text{=}CH\text{-}\dot{C}H\text{-}OCH_3$ und entsteht aus den C-Atomen 1 und 2 oder 2 und 3 oder 3 und 4. Im Massenspektrum des Methyl-di-O-methyl-di-O-trimethylsilylglucosids (11h), das durch saure Hydrolyse aus Permethyl-KA I und anschließende Silylierung erhalten wurde, fehlt das Bruchstück der Masse 88. Folglich können die benachbarten C-Atome 1,2; 2,3 und 3,4 keine α-di-OCH_3-Gruppen tragen. Das Zuckerspaltprodukt muß also die Konfiguration 11g A haben. Die typischen 2-Kohlenstoff-Bruchstücke der Permethylglucopyranose treten im Massenspektrum von 11h bei m/e 146 und m/e 204 auf.

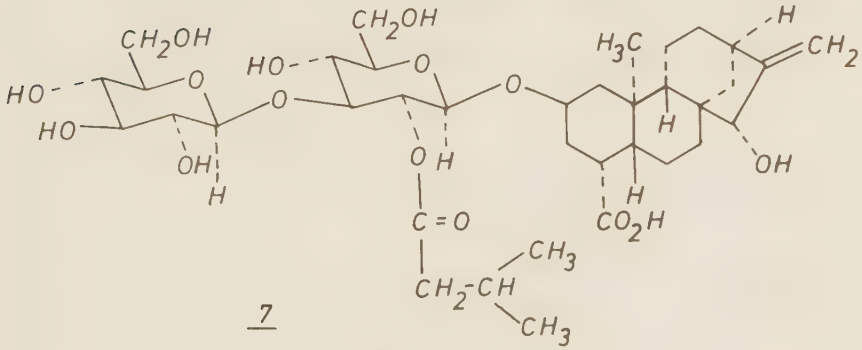


m/e 146



m/e 204

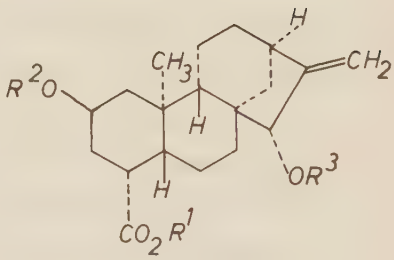
11g wurde synthetisiert. Die Massenspektren des Solvolyseproduktes 11g und seinem TMS-Äther 11h sind identisch mit dem MS des synthetischen Produktes und seinem TMS-Äther. Damit kommt der Verbindung KA I die Konfiguration eines 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2'O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-ß-D-glucopyranosids (7) zu.

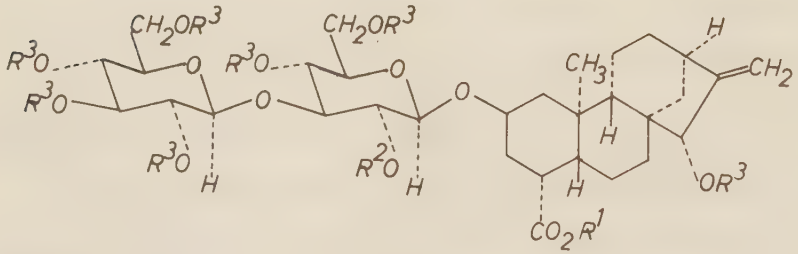


7

3. Formeln der Derivate von 7 und 8

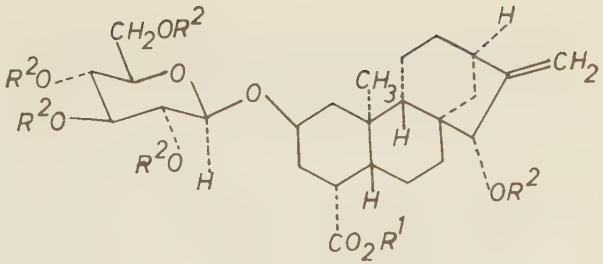
	R^1	R^2	R^3
2	H	H	H
2a	CH_3	H	H
2b	CH_3	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$
2c	CH_3	H	CH_3
2d	CH_3	$Si(CH_3)_3$	CH_3

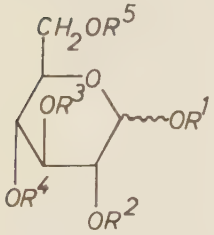




	R^1	R^2	R^3
7	H	$COCH_2\text{-}CH(CH_3)_2$	H
7a	H	$COCH_2\text{-}CH(CH_3)_2$	$COCH_3$
7b	CH_3	$COCH_2\text{-}CH(CH_3)_2$	H
7c	CH_3	$COCH_2\text{-}CH(CH_3)_2$	$COCH_3$
7d	CH_3	$COCH_2\text{-}CH(CH_3)_2$	CH_3
9	H	H	H
9a	H	$COCH_3$	$COCH_3$
9b	CH_3	H	H
9c	CH_3	$COCH_3$	$COCH_3$
9d	CH_3	CH_3	CH_3

	R^1	R^2
8	H	H
8a	H	$COCH_3$
8b	CH_3	H
8c	CH_3	$COCH_3$
8d	CH_3	CH_3



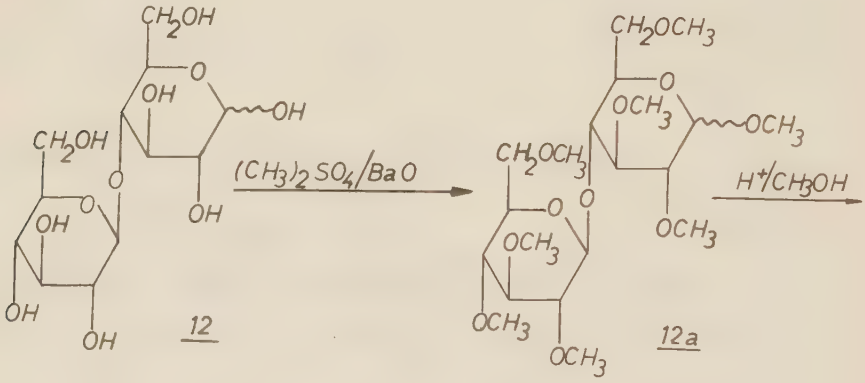


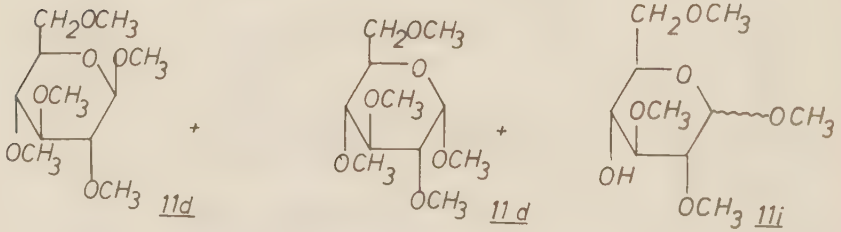
	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
11	H	H	H	H	H
11a	CH_3	H	H	H	H
11b	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$
11c	CH_3	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$
11d	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
11e	CH_3	CH_3	H	CH_3	CH_3
11f	CH_3	CH_3	$Si(CH_3)_3$	CH_3	CH_3
11g	CH_3	H	H	CH_3	CH_3
11h	CH_3	$Si(CH_3)_3$	$Si(CH_3)_3$	CH_3	CH_3
11i	CH_3	CH_3	CH_3	H	CH_3
11j	CH_3	H	CH_2-C_6H_5	H	H
11k	CH_3	CH_3	CH_2-C_6H_5	CH_3	CH_3
11l	CH_3	H	H	C_6H_5-CH	
11m	CH_3	CH_2-C_6H_5	CH_2-C_6H_5	C_6H_5-CH	
11n	CH_3	CH_2-C_6H_5	CH_2-C_6H_5	H	H
11o	CH_3	CH_2-C_6H_5	CH_2-C_6H_5	CH_3	CH_3

V. Synthese der Vergleichsverbindungen

1. Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid(11d) und Methyl-2,3,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11i)

erhielt man durch Permethylierung von Cellobiose (12) zu 12a und anschließender Spaltung mit methanolischer Salzsäure [30].

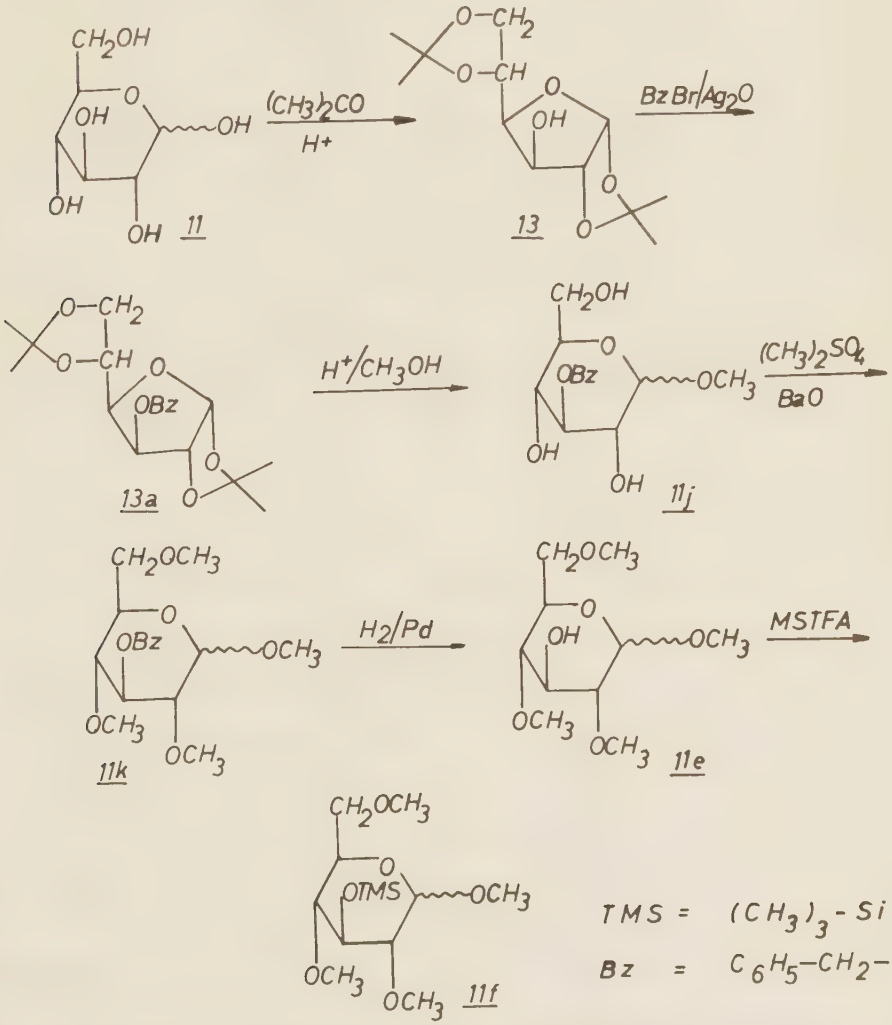




Die Trennung der Spaltprodukte erfolgte am Gaschromatographen der GC-MS-Kombination.

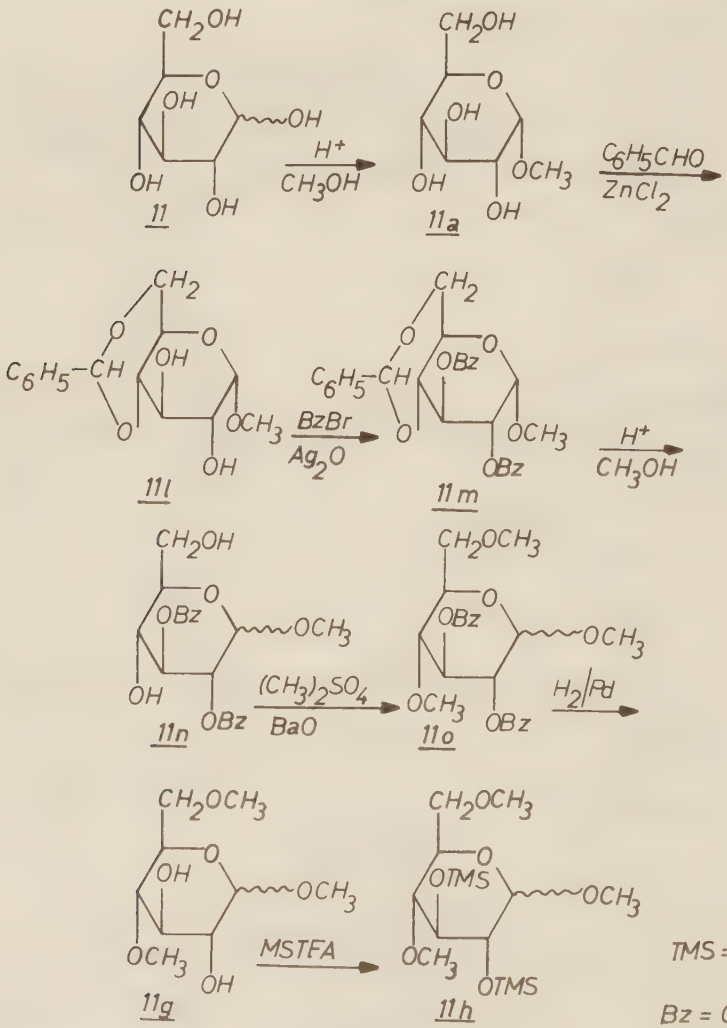
2. Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e)

wurde, wie aus dem folgenden Formelschema ersichtlich ist, aus D-Glucose dargestellt [31]:



Die Trennung der anomeren Trimethylsilyläther gelang im Gaschromatographen der GC-MS-Kombination.

3. Die Darstellung des Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosids (11g) erfolgte ebenfalls aus D-Glucose [32]:



Die Anomeren ließen sich nicht im Gaschromatographen trennen.

VI. Diskussion der Massenspektren

Die Massenspektren der permethylierten, deuteriummarkierten Glucose sind von Kochetkov et al.[29] beschrieben: Die intensivsten Ionen haben nach Kochetkov et al. die Strukturen:

m/e 45: $CH_2=\overset{+}{O}CH_3$ entsteht im wesentlichen aus C-6

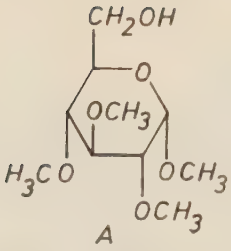
m/e 75: $CH_3OCH=CH-\overset{+}{O}H_2$ entsteht aus C-1 und C-2, C-2 und C-3, C-3 und C-4

m/e 88: $CH_3O\dot{C}H-CH=\overset{+}{O}CH_3$ entsteht aus C-1 und C-2, C-2 und C-3oder C-3 und C-4

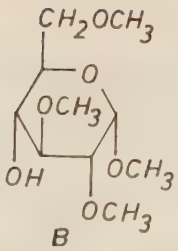
m/e 101: $CH_3\overset{+}{O}=CH-CH=CH-OCH_3$ entsteht hauptsächlich aus C-2, C-3 und C-4

Das Ion der Masse 219 entsteht aus dem Molekülion durch Verlust eines OCH_3-Radikals.

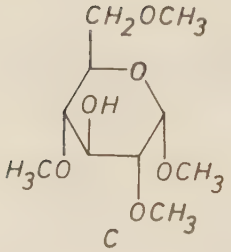
Nach den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich die Intensitäten von Schlüsselionen in den Massenspektren permethylierter Glucosederivate mit jeweils einer freien OH-Gruppe (A-D) abschätzen.



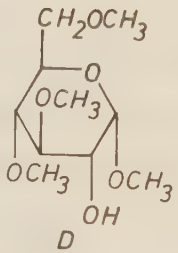
A



B



C



D

Zu einer sicheren Identifizierung kann jedoch auf einen direkten Vergleich der Massenspektren nicht verzichtet werden, zumal die Bruchstückbildung durch eine OH-Gruppe wesentlich beeinflußt wird.

Bei den ß-Anomeren der methylierten Methylglucoside beobachtet man bei den Ionen mit hohen Massen immer eine geringere Intensität als bei den α-Anomeren (Abb. 9 und 10).

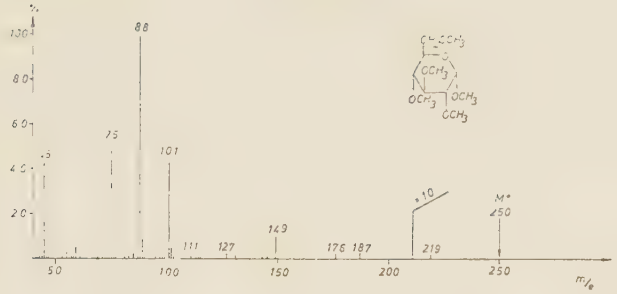


Abb. 9 Massenspektrum des Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucosids (11d)

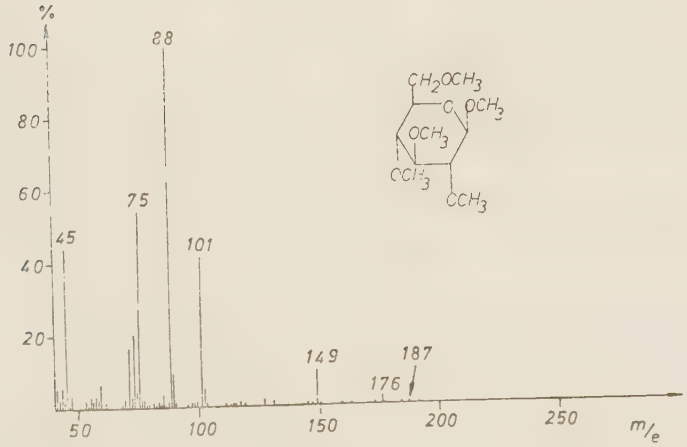


Abb.10 Massenspektrum des Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucosids (11d)

Im Massenspektrum (Abb. 11) des Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosids (11e) ist das Bruchstück der Masse 88, das im Spektrum von Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranosid (11d) 100 % Intensität erreicht, nur noch von geringer Intensität. Dafür erscheint das um 14 Masseneinheiten leichtere Bruchstück m/e 74. Das Ion der Masse 71 erreicht hier 100 %. Es enthält die C-Atome 4,5 und 6:

$CH_2=CH-CH=\overset{+}{O}CH_3$

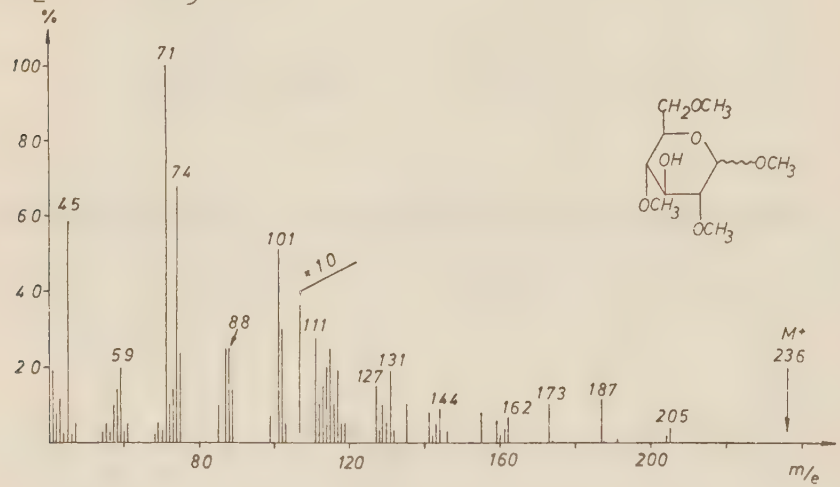


Abb. 11 Massenspektrum des Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosids (11 e).

Das Massenspektrum des 4-OH-Isomeren (11i) ist durch ein intensives Ion der Masse 45 gekennzeichnet. Offenbar bildet sich das Bruchstück aus C-6 bevorzugt durch den Einfluß der benachbarten OH-Gruppe an C-4.

Die Spaltstücke m/e 101, 88 und 75 entstehen wie die gleicher Masse in den Massenspektren der Permethyl-glucoside (11d).

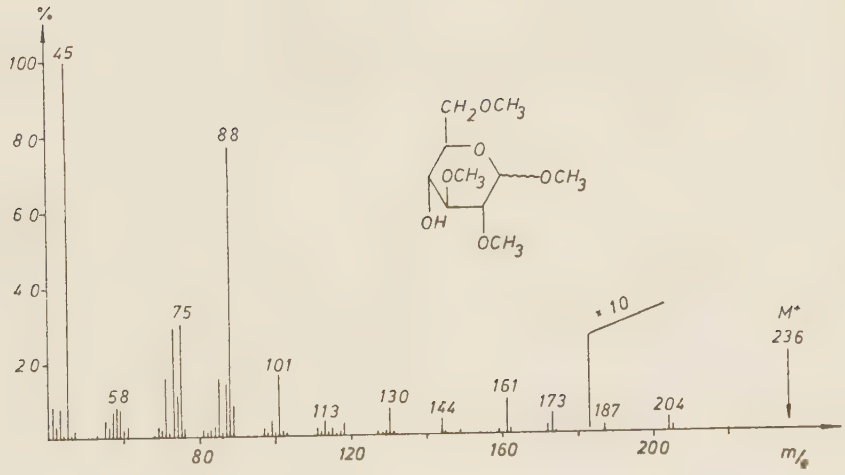


Abb. 12 Massenspektrum des Methyl-2,3,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosids (11i).

Schlüsselbruchstücke:

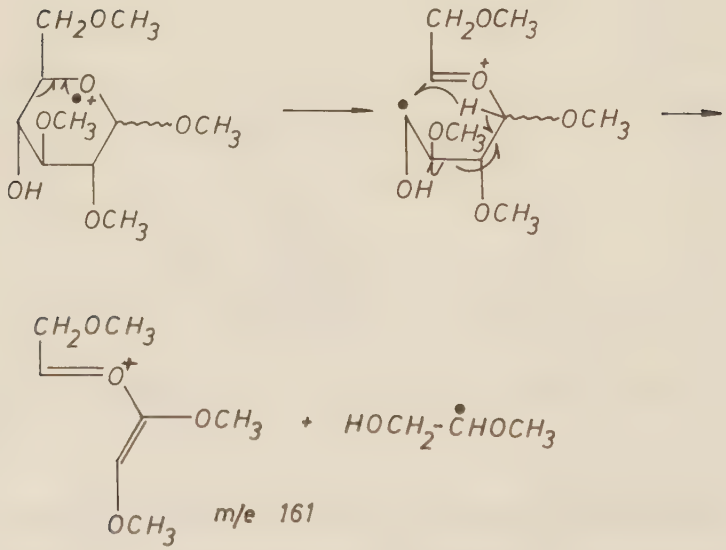
m/e 205: $M^+-CH_3O\cdot$

m/e 204: M^+-CH_3OH

m/e 187: $M^+-(H_2O+\cdot OCH_3)$

m/e 173: $M^+-(CH_3OH+\cdot OCH_3)$

m/e 161:



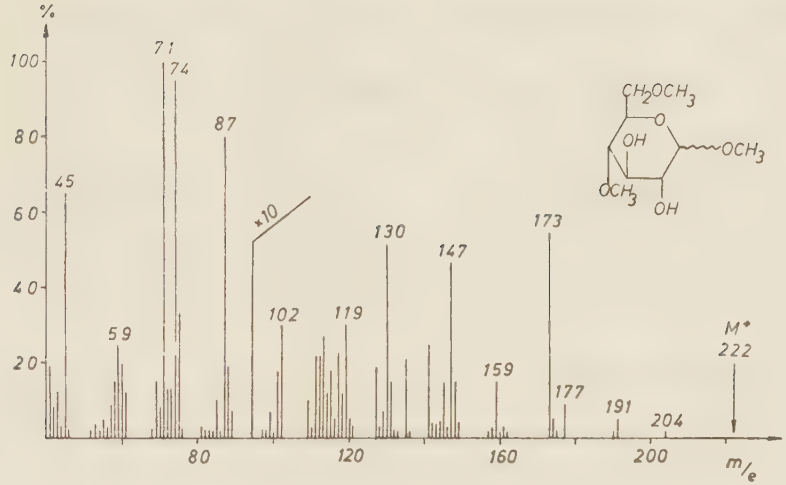


Abb. 13 Massenspektrum des Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosids (11g)

Schlüsselbruchstücke:

m/e 204: M^+-H_2O

m/e 191: $M^+-CH_3O^\cdot$

m/e 190: M^+-CH_3OH

m/e 187: $M^+-(H_2O+\cdot OH)$

m/e 177: $M^+-{}^\cdot CH_2OCH_3$

m/e 173: $M^+-(H_2O+{}^\cdot OCH_3)$

m/e 159: $M^+-({}^\cdot CH_2OCH_3+H_2O)$

m/e 147: $M^+-(H_2O+CH_3OH+{}^\cdot OCH_3)$

m/e 130: $M^+-(H_2O+CH_3OCH=CH-OH)$

m/e 101: $CH_3\overset{+}{O}=CH-CH=CH-OCH_3$ entsteht aus den C-Atomen 4,5 und 6

m/e 87: $CH_3=\overset{+}{O}CH-CH=CH-OH$ entsteht aus den C-Atomen 2,3 und 4

m/e 74: $CH_3-\overset{+}{O}=CH-\dot{C}H-OH$ enthält die C-Atome 1 und 2 oder 3 und 4

m/e 71: $CH_2=CH-CH=\overset{+}{O}CH_3$ enthält die C-Atome 4,5 und 6

m/e 45: $CH_2=\overset{+}{O}CH_3$ wird am häufigsten aus C-Atom 6 gebildet.

Trimethylsilyläther

Die Trimethylsilyläther der teilmethylierten Glucose brechen im Massenspektrometer wie die permethylierte Glucose. Allerdings treten die typischen Trimethylsilylbruchstücke m/e 73 und 75 zusätzlich auf, ebenso wie die M^+-CH_3-Abspaltungen aus dem Trimethylsilylrest.

Da die Trimethylsilylgruppe die Ladung der Ionen stabilisiert, sind die Massenspektren durch intensive silylhaltige Bruchstücke charakterisiert.

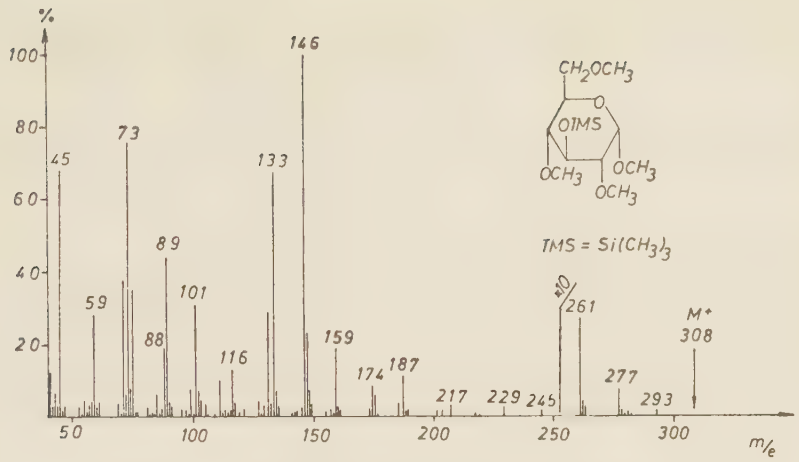


Abb. 14 Massenspektrum des Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-3-O-trimethylsilyl-α-D-glucopyranosids (11f)

Schlüsselbruchstücke:

m/e 293: $M^+ - \cdot CH_3$

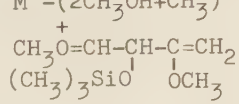
m/e 277: $M^+ - CH_3O^\cdot$

m/e 261: $M^+ - (CH_3\cdot + CH_3OH)$

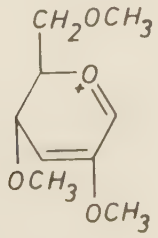
m/e 245: $M^+ - (CH_3O\cdot + CH_3OH)$

m/e 229: $M^+ - (2CH_3OH + CH_3^\cdot)$

m/e 217:



m/e 187:



m/e 159: $(CH_3)_3\overset{+}{S}iO=CH-CH=CH-OCH_3$ enthält die C-Atome 2,3 und 4

m/e 146: $CH_3\overset{+}{O}=CH-\dot{C}H-OSi(CH_3)_3$ entsteht aus den C-Atomen 2 und 3 oder 3 und 4

oder

$CH_3O-\dot{C}H-CH=\overset{+}{O}Si(CH_3)_3$

m/e 133: $(CH_3)_3SiO-CH=\overset{+}{C}H-OH_2$ enthält die C-Atome 2 und 3 oder 3 und 4

m/e 75: $(CH_3)_2\overset{+}{S}i=OH$

m/e 73: $(CH_3)_3Si^+$

Die Bruchstücke bei tieferen Massenzahlen entstehen wie die der permethylierten Glucose.

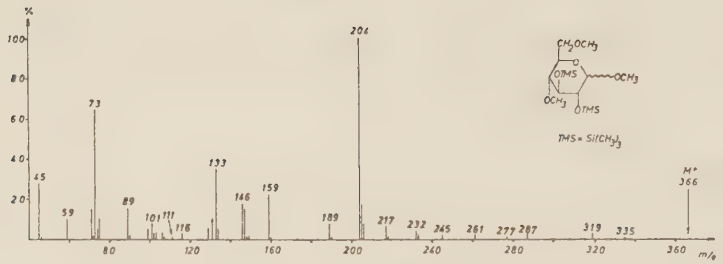


Abb. 15 Massenspektrum des Methyl-4,6-di-O-methyl-2,3-di-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosids (11h)

Schlüsselbruchstücke:

m/e 351: $M^+-CH_3\cdot$

m/e 335: $M^+-.OCH_3$

m/e 319: $M^+-(CH_3OH+CH_3\cdot)$

m/e 303: $M^+-(CH_3OH+CH_3O\cdot)$

m/e 287: $M^+-(CH_3OH+CH_3OH+CH_3\cdot)$

m/e 277: $M^+-(\cdot O-Si(CH_3)_3)$

m/e 261: $M^+-(CH_3)_3SiOH+\cdot CH_3)$

m/e 204: $(CH_3)_3SiO=CH-\dot{C}H-OSi(CH_3)_3$

Die Bruchstücke der unteren Massen entstehen wie die Fragmente von (11g).

Permethyl-Atractyloside

Die Massenspektren der Permethyl-Atractyloside 7d, 8d und 9d setzen sich im wesentlichen aus den Spaltstücken der Permethylglucosereste und den Bruchstücken des Aglykonteils zusammen.

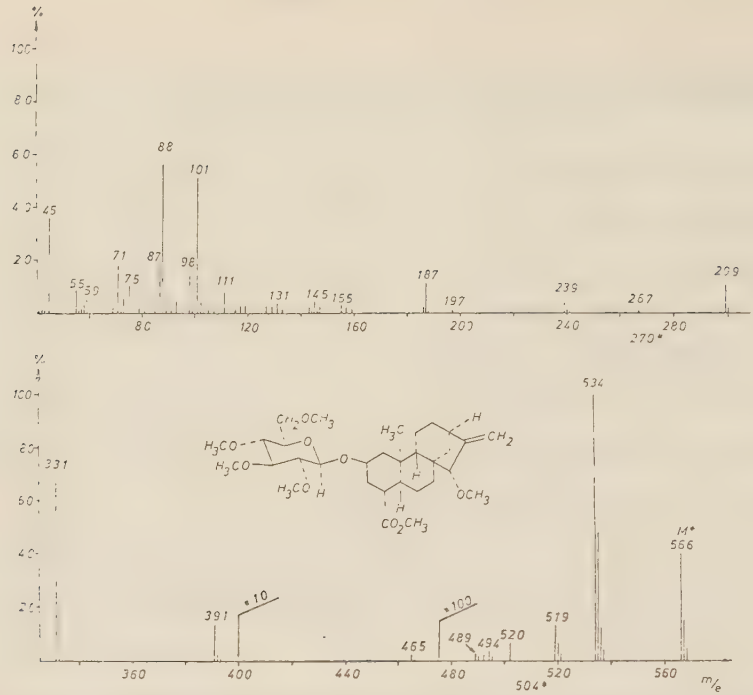


Abb. 16 Massenspektrum des 2',3',4',6',15-Penta-O-methyl-20-ß-D-glucopyranosyl-atractyligeninmethylesters (8d)

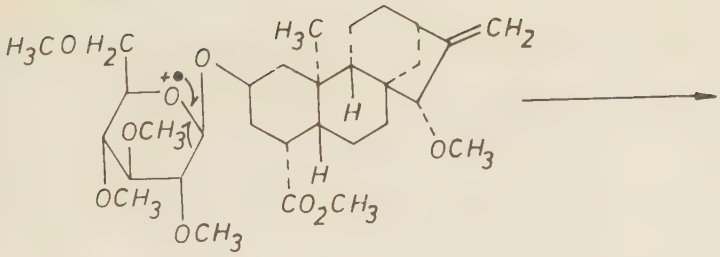
Schlüsselbruchstücke:

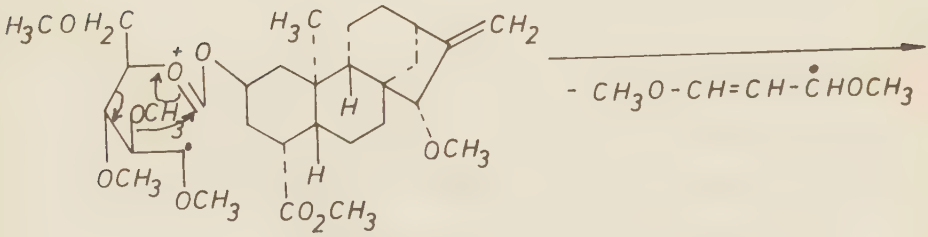
m/e 534: M-CH_3OH

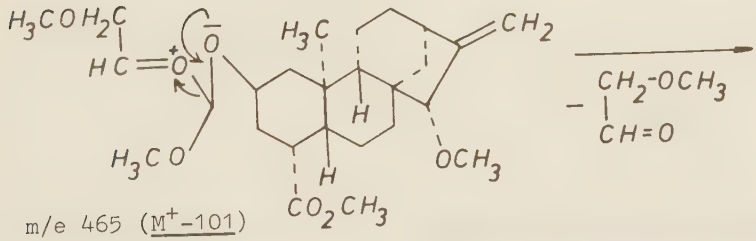
m/e 519: M-(CH_3-OH+CH_3·)

m/e 502: M-2CH_3OH

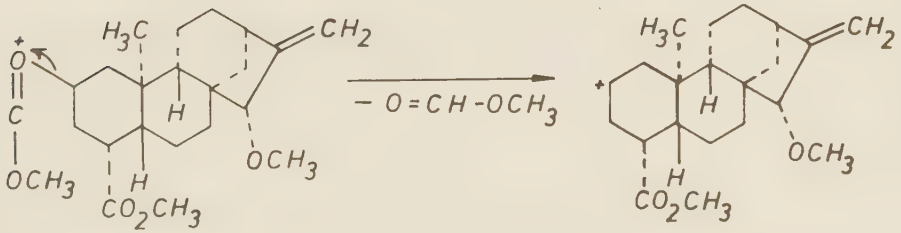
Die Bildung der Bruchstücke m/e 465, 391 und 331 erfolgt nach einem Mechanismus, den Kochetkov et al.[39] zur Interpretation der Massenspektren von permethylierten Disacchariden postulierten.





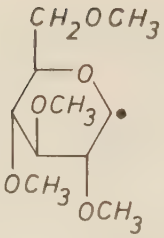


m/e 465 ($\underline{M^+-101}$)



m/e 391 ($\underline{M^+-175}$)

m/e 331 (M^+-235)

m/e 315: M^+-  $-CH_3OH$

m/e 299: 331-CH_3OH

m/e 267: 331-$2CH_3OH$

m/e 239: 331-($2CH_3OH$+CO)

m/e 98: siehe Seite 16

Die Fragmente bei den niedrigeren Massenzahlen entstehen wie die Spaltstücke der permethylierten Glucose.

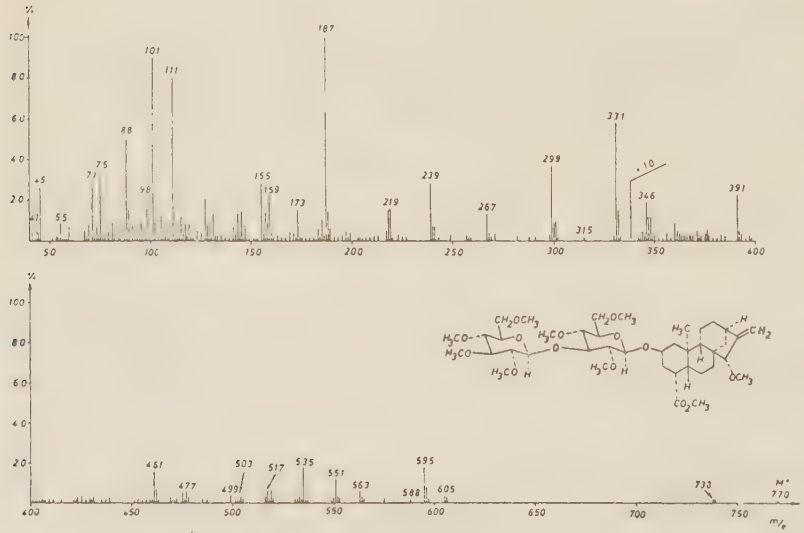
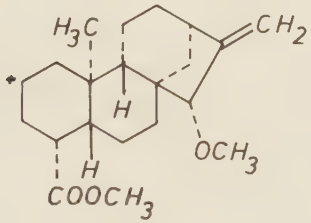


Abb. 17 Massenspektrum des 2',4',6',2",3",4",6",15-Octa-O-methyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethylester)-ß-D-glucopyranosids (9d)

Die Schlüsselbruchstücke m/e 595 (M^+-175) und m/e 535 (M^+-235) entstehen aus dem zweiten Permethylglucoserest von 9d nach den gleichen Mechanismen wie die entsprechenden Spaltstücke von 8d.

m/e 605: M^+-(101+2·CH_3OH)

m/e 331:



m/e 299: 331-CH_3OH

m/e 239: 331-(2CH_3OH+CO)

Die Fragmente bei m/e 219 und tieferen Massenzahlen sind Spaltstücke, die aus dem Permethyldisaccharid-Teil des Moleküls von 9d stammen. Diese Schlüsselbruchstücke wurden auch von Kochetkov et al. [39] in den Massenspektren der permethylierten Disaccharide gefunden.

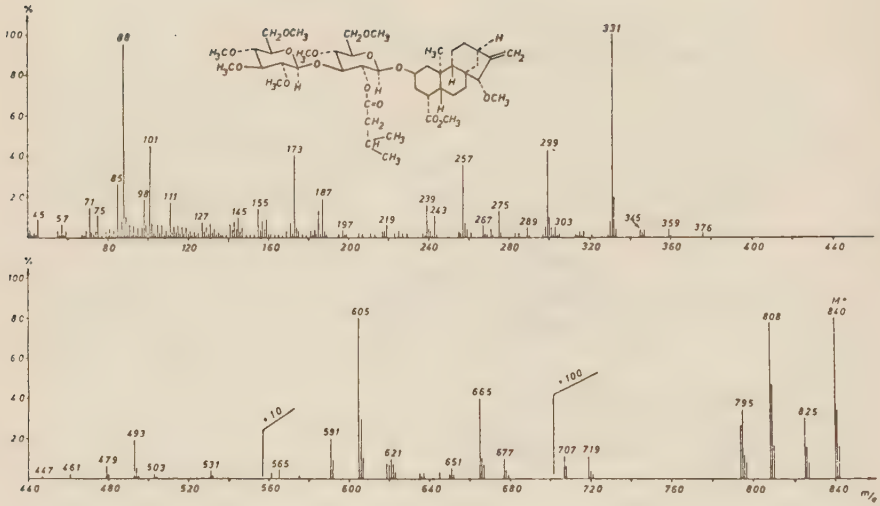


Abb. 18 Massenspektrum des 4',6',2",3",4",6",15-Hepta-O-methyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethylester)-ß-D-glucopyranosids (7d)
(Varian MAT CH 7; Ionenquellentemp. 150°C, Probenverdampfungstemp. 160°C).

Schlüsselbruchstücke:

m/e 825: $M^+-CH_3\cdot$

m/e 809: $M^+-\cdot OCH_3$

m/e 808: M^+-CH_3OH

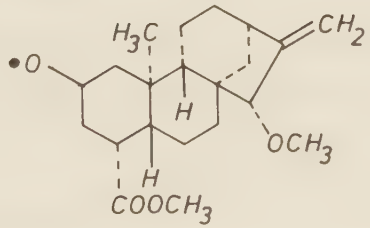
m/e 795: $M^+-\cdot CH_2-OCH_3$

m/e 707: $M^+-(101+CH_3OH)$

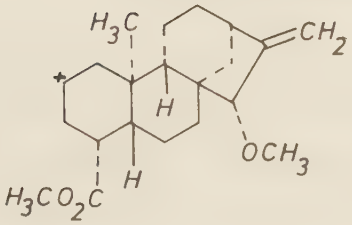
m/e 665: M^+-175

m/e 605: M^+-235

m/e 493: M^+-



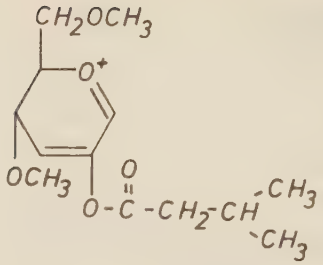
m/e 331:



m/e 299: $331-CH_3OH$

m/e 257:

$C_{13}H_{21}O_5^+$



m/e 173: 257-O=C=CH-CH(CH$_3$)$_2$

$C_8H_{13}O_4^+$

Im unteren Massenbereich ist das MS wieder durch die Spaltstücke der Zuckerkomponenten charakterisiert. Der Peak der Masse 98 entsteht aus dem C- und D-Ring des 15-Methoxy-atractyligeninteils.

Methoxy-Atractyligenin-Derivate

In den Massenspektren der Methoxy-atractyligenin-Derivate wird die Bruchstückbildung wesentlich von der Methoxygruppe beeinflußt. Dies zeigt sich im Spektrum von 2b an der Bildung eines intensiven Ions der Masse 98 (Mechanismus: S.16)

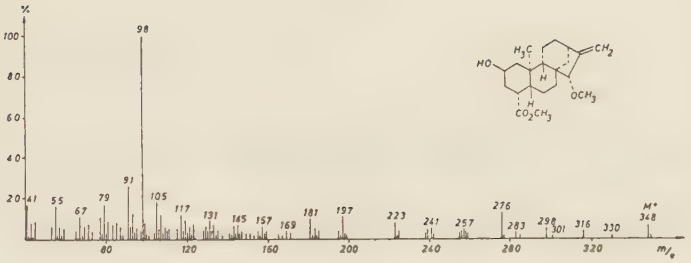


Abb. 19 Massenspektrum des 15-O-Methyl-atractyligenin-methylesters (2c)

Schlüsselbruchstücke:

m/e 330: M^+-H_2O

m/e 316: M^+-CH_3OH

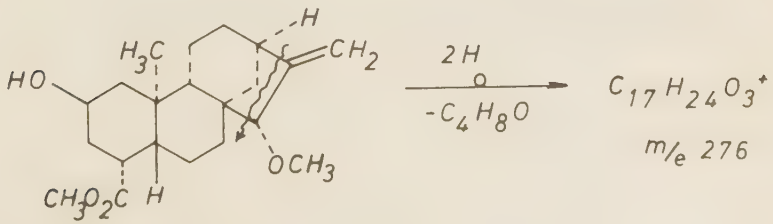
m/e 301: $M^+-(CH_3OH-CH_3\cdot)$

m/e 298: $M^+-(CH_3OH+H_2O)$

m/e 283: $M^+-(CH_3OH+H_2O+CH_3\cdot)$

m/e 276:

(M^+-72)



Im MS des 2b-Trimethylsilyläthers (2c) tritt das Spaltstück M^+-72 nicht mehr auf. Die anderen Schlüsselbruchstücke werden analog zu denen im MS von 2b gebildet.

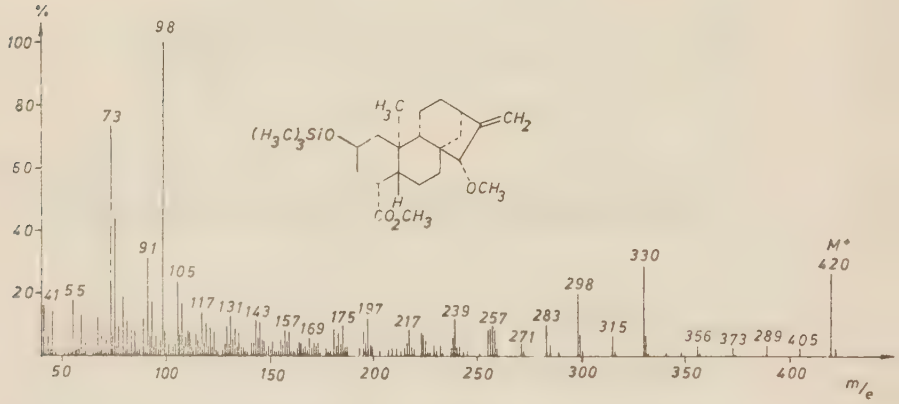


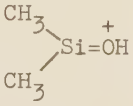
Abb. 20 Massenspektrum des 15-O-Methyl-2-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylesters (2d)
(GC-MS-Kombination, Ionenquellentemp. 150°C)

Schlüsselbruchstücke:

m/e 405: $M^+-CH_3\cdot$
m/e 389: $M^+-\cdot OCH_3$
m/e 373: $M^+-(CH_3OH+CH_3\cdot)$
m/e 356: $M^+-2\ CH_3OH$
m/e 330: $M^+-(CH_3)_3SiOH$

m/e 315: $M^+-((CH_3)_3SiOH+CH_3\cdot)$

m/e 298: $M^+-((CH_3)_3SiOH+CH_3OH)$

m/e 75: 

m/e 73: $(CH_3)_3Si^+$

Das Massenspektrum des hydrierten Methoxyderivats des Atractyligenins zeigt ein anderes Fragmentierungsschema: Ein Ion der Masse 98 tritt nicht mehr auf. Im Spektrum dominiert die Abspaltung des D-Ringes zu einem Spaltstück der Masse 277, aus dem sich durch folgende H_2O-Abspaltung das Ion der Masse 259 bildet. Das Ion der Masse 259 kann aber auch aus dem M^+-H_2O-Bruchstück, durch anschließende Abspaltung des D-Ringes entstehen.

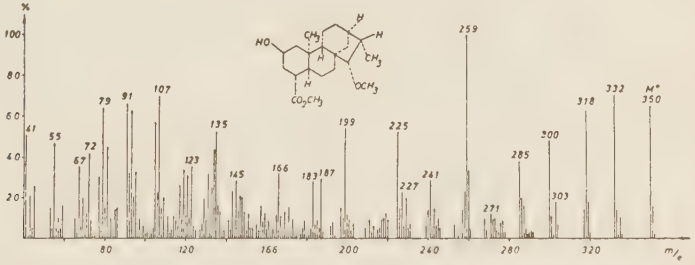


Abb. 21 Massenspektrum des 15-O-Methyl-16ß,17-dihydroatractyligeninmethylesters
(GC-MS-Kombination, Ionenquellentemp. 150°C)

Schlüsselbruchstücke:

m/e 332: M^+-H_2O

m/e 318: M^+-CH_3OH

m/e 303: $M^+-(CH_3OH+CH_3\cdot)$

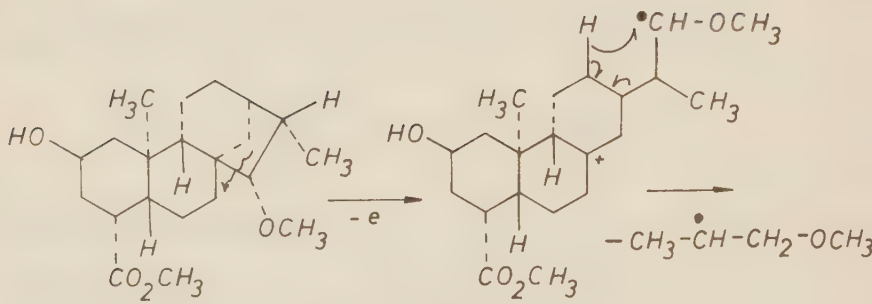
m/e 300: $M^+-(H_2O+CH_3OH)$

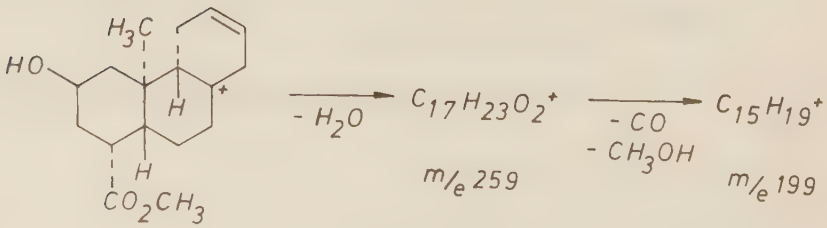
m/e 285: $M^+-(H_2O+CH_3OH+CH_3\cdot)$

m/e 241: $M^+-(\cdot CO_2CH_3+CH_3OH+H_2O)$

m/e 225: $M^+-(H_2O+2\ CH_3OH+CO+CH_3\cdot)$

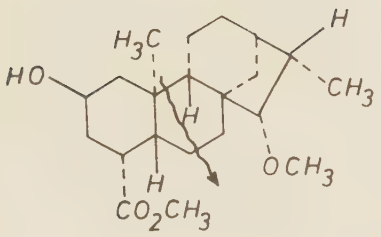
m/e 259:





m/e 277

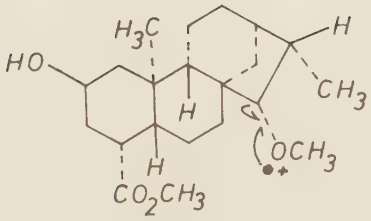
m/e 166:

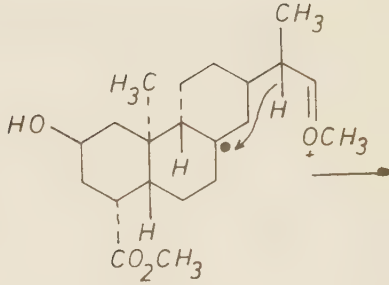


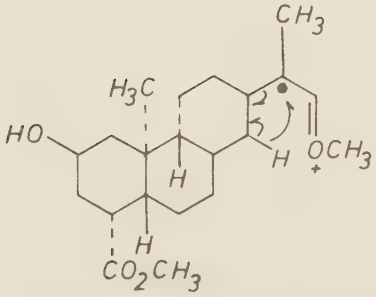
$C_{11}H_{18}O^{+}$ — $-CH_3OH$ → $C_{10}H_{14}^{+}$

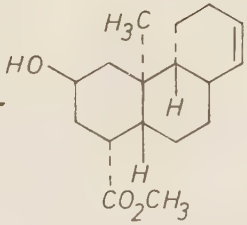
m/e 166 m/e 134

m/e 72:









+ $CH_3\dot{C}H-CH=\overset{+}{O}CH_3$

m/e 72

VII. Abbildungen der IR- und NMR-Spektren

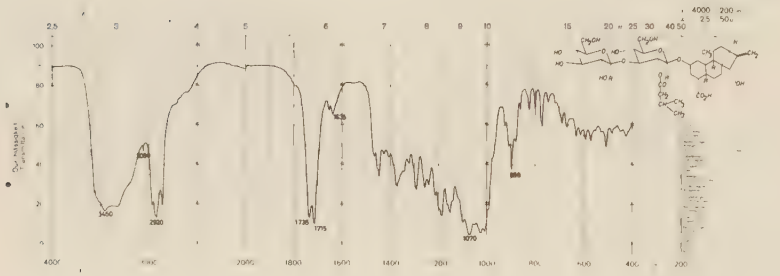


Abb. 22 IR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids I (7)

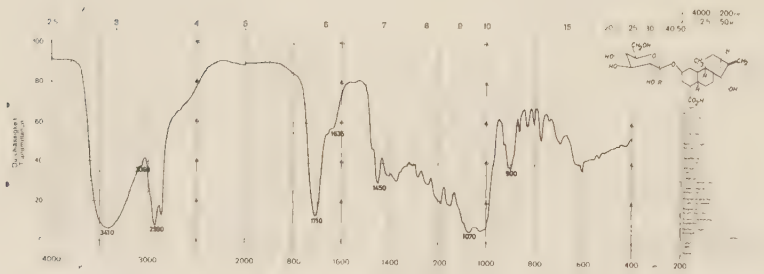


Abb. 23 IR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids II (8)

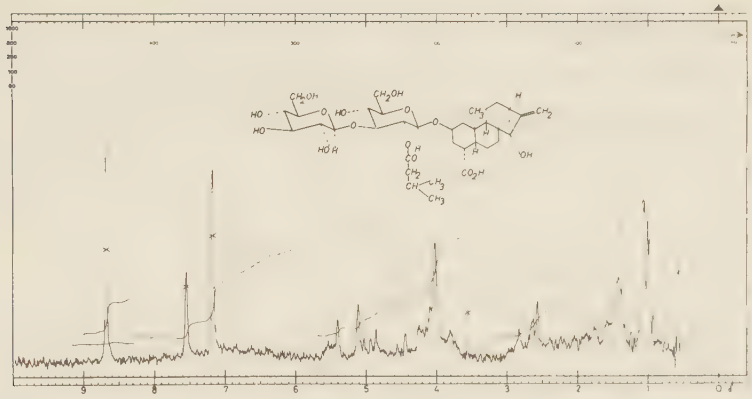


Abb. 24 NMR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids I (7)

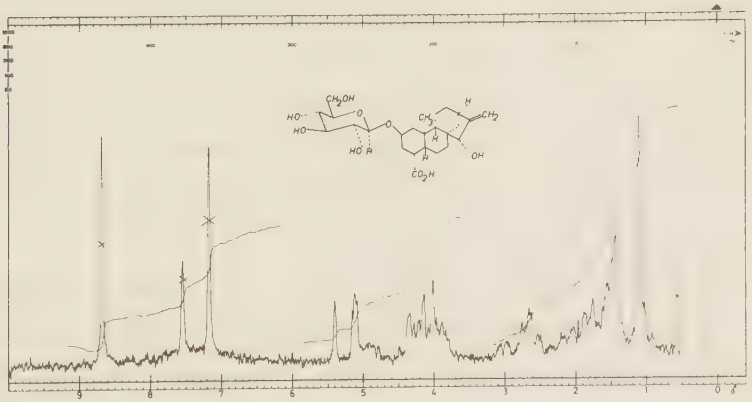
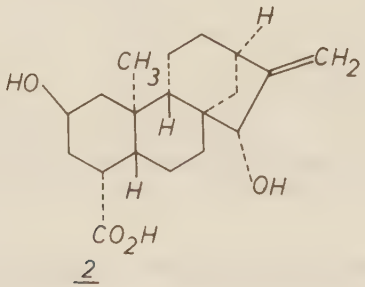


Abb. 25 NMR-Spektrum des Kaffee-Atractylosids II (8)

C. ZUSAMMENFASSUNG

Röstkaffee enthält zu 0,1 % das Diterpenoid Atractyligenin (2)[2]. 2 ist das Aglykon von zwei Glykosiden, die in Kaffeebohnen vorkommen:



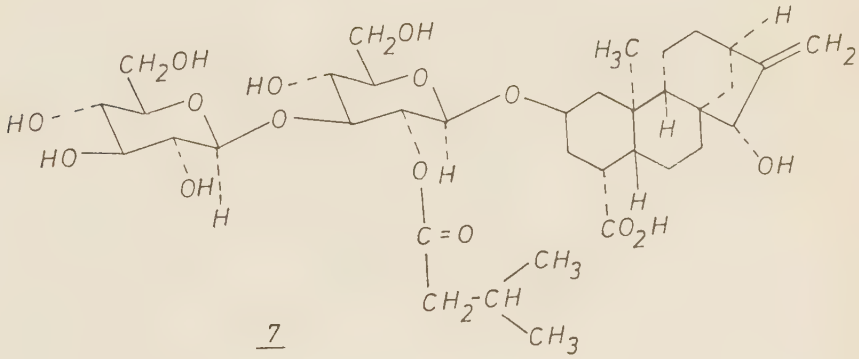
2

Aus den grünen Bohnen von Coffea arabica wurden die beiden "Kaffee-Atractyloside" 7 und 8 isoliert. Ihre Reindarstellung gelang durch Trennung an Sephadex LH 20 und nachfolgender Säulen- und Dünnschichtchromatographie an Kieselgel. Zur Auffindung der "Kaffee-Atractyloside" wurden kleine Proben der Chromatographiefraktionen enzymatisch gespalten und nach Methylierung mit Diazomethan in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert.

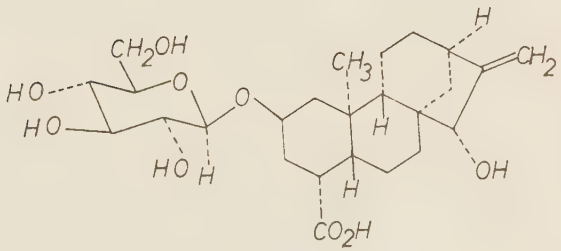
Aus 5 kg Rohkaffee wurden 1,1 g KA I (7) und 1,0 g KA II (8) erhalten, das entspricht einem Gehalt von je 0,02 %. Die Strukturaufklärung von (7) und (8) gelang durch massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte der Permethylderivate 7d und 8d, sowie durch IR- und NMR-Spektroskopie.

Aus den NMR-Spektren ließ sich auch die ß-glucosidische Verknüpfung aller Zuckerreste ableiten.

KA I besitzt die Struktur eines 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-ß-D-glucopyranosids (7), KA II die eines 2-O-ß-D-Glucopyranosyl-atractyligenins (8).

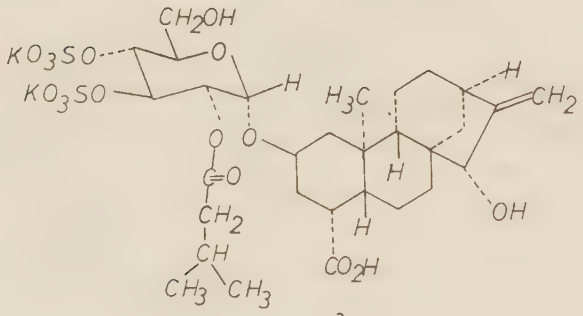


7



8

7 und 8 weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem von Piozzi et al.[5] aus der Mastix-Distel (Atractylis-gummifera L.) isoliertem Atractylosid (3) auf, das die mitochondriale Nucleotidtranslocase hemmt und daher ein starkes Zellgift ist[7-9].



3

Deshalb wurden Proben von 7 und 8 von Prof. Dr. E.M. Klingenberg auf ihre Atractylosid-Wirkung an isolierten Mitochondrien getestet.

Nach diesen Ergebnissen beträgt die Konzentration von 7 für eine 50 %ige Hemmung der Zellatmung zwischen 30 und 80 µMol. 7 ist damit etwa 500 mal weniger wirksam als das Atractylosid (3). 8 hat nur eine geringe biochemische Wirksamkeit.

Untersuchungen von Dr. Sies mit 7 an der isolierten intakten Leber ergaben nur eine geringe Hemmung der Zellatmung. Offenbar wird 7 in der Leber schnell entgiftet.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Bestimmung der physikalischen Daten

1) Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Varian MAT CH 4-Massenspektrometer (E-4B-Ionenquelle), einem Varian CH 7-Massenspektrometer bzw. einem Varian MAT 731 - Massenspektrometer durch Direkteinführung der Proben in die Ionenquelle, sowie mit dem Varian MAT CH 7-Massenspektrometer, kombiniert mit einem Varian 1700-Gaschromatographen, bei 70 eV aufgenommen.

Die Verdampfungstemperatur der Proben und die Ionenquellentemperatur sind auf den Massenspektren verzeichnet. Alle angegebenen Bruttoformeln wurden durch "peak matching" auf einem MAT 731-Massenspektrometer bestimmt, ebenso die mit Bruttoformeln versehenen Bruchstücke.

2) Felddesorptionsmassenspektren

Die FD-Massenspektren wurden an einem Varian MAT 711-Massenspektrometer, versehen mit einer FD-Ionenquelle bei einer Beschleunigungsspannung von 8 kV gemessen.

3) Kernresonanzspektren

Die NMR-Spektren wurden auf einem Varian HA 100 - und auf einem Varian XL-100-Spektrometer (100 MHz) mit TMS als internem Standard registriert.

4) Infrarotspektren

Die IR-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer 621-Spektrometer aufgenommen (KBr-Preßling).

5) Optische Drehung

Die Messungen erfolgten an einem Perkin Elmer 141-Polarimeter in einer 1 dm-Mikroküvette (1 ml) bei 20° C. Als Lösungsmittel diente Äthanol (p. a. Merck).

6) Die Schmelzpunkte

wurden mit einer Kofler-Apparatur bestimmt, die Werte sind unkorrigiert.

7) Molekulargewichtsbestimmungen

wurden mit einem Mecrolab-Osmometer 301 A bei einer Konzentration von 17 mg/cm^3 ausgeführt.

8) Gaschromatographie

Gaschromatographische Trennungen erfolgten nur am Varian 1700-Gaschromatograph des GC-MS-Kombinationsgerätes, versehen mit einer 1,80 m langen Glassäule (Innendurchmesser 2 mm, 2 % SE 30 auf Chromosorb W, AW, DMCS; 80 - 100 mesh). Die Injektortemperatur betrug 270° C, die Säulentemperatur wurde von 100° C bis 300° C mit 10°/Min. programmiert. Als Trägergas diente Helium mit einem Durchfluß von 16 ml/Min. Die Temperatur des Seperators (Biemann-Watson-Typ) und der GC-MS-Verbindungskapillare wurde auf 240° C gehalten. Als GC-Detektor diente die Totalionenstromanzeige des Massenspektrometers.

II. Beschreibung der Aufarbeitungsverfahren

1) Extraktion und Verteilung

1 kg Rohkaffee (grüne Bohnen von Coffea arabica) wurden in einem Mixer * zerkleinert und mit 4 l Methanol 24 Stunden im Soxhlet extrahiert. Der Gewichtsverlust des Kaffees betrug 235 g.

* Je 5 kg gemahlener Rohkaffee der Sorten Coffea arabica und Coffea canephora (robusta) wurden von Dr. O.G. Vitzthum, Kaffee-HAG, zur Verfügung gestellt.

Den Methanolextrakt engte man am Rotationsverdampfer ein. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator erhielt man 173 g grünliches Öl. Der Rückstand wurde mit 1 l Methylenchlorid und 1,3 l dest. Wasser versetzt und die Mischung über Nacht mit einem Magnetrührer gerührt.

Nach der Phasentrennung im Scheidetrichter wurde die organische Phase zweimal mit je 200 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator erhielt man 61,9 g öligen Rückstand.

Der wäßrigen Phase wurde das Waschwasser der org. Phase zugesetzt. Nach zweimaligem Extrahieren (um die Trennung zu vervollständigen) der gesamten wäßrigen Phase (Extrakt und Waschwasser) mit je 300 ml Methylenchlorid wurde zur Vertreibung des gelösten Methylenchlorids auf 40° C erwärmt und unter Rühren über Nacht ein Stickstoffstrom über die Lösung geleitet. Die Methylenchlorid-Phase wurde verworfen.

Nach dem Abkühlen adsorbierte man die Glykoside der wäßrigen Phase an 1 kg Amberlite XAD 2 [23], wusch die Säule mit 2 l dest. Wasser nach und eluierte - nach dem Trockensaugen der Säule an der Wasserstrahlpumpe - mit 2 l Methanol. Eindampfen der Methanollösung und Trocknen im Vakuumexsikkator ergab 16,8 g glykosidhaltigen Rückstand.

Dieses Verfahren wurde mit 5 kg Coffea arabica (Columbia) wiederholt:

Gewichtsverlust: 1,410 g
Methanolgesamtextrakt: 765 g
Eindampfungsrückstand der Methylenchloridphase: 278 g
Eindampfungsrückstand des Amberlite XAD 2-Eluats: 82 g (Glykosidfraktion)

In gleicher Weise arbeitete man 5 kg grüne Bohnen von Coffea canephora (robusta) auf. Die wäßrige Phase, die bei der Verteilung zwischen Methylenchlorid und Wasser anfällt, wurde jedoch mit Ethylacetat statt Methylenchlorid extrahiert.

Gewichtsverlust: 1,346 g
Methanolgesamtextrakt: 888 g
Eindampfungsrückstand der Methylenchloridphase: 255 g
Eindampfungsrückstand des Ethylacetatextraktes: 17,6 g
Eindampfungsrückstand des Amberlite XAD 2-Eluats: 73,6 g (Glykosidfraktion)

Der Ethylacetatextrakt enthielt einen Teil des Coffeins. Das restliche Coffein verblieb in der wäßrigen Phase.

2) Trennung der glykosidischen Fraktionen

a) 1-kg Ansatz

Der glykosidhaltige Rückstand (16,8 g) wurde an 500 g Sephadex LH 20 chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Methanol. Nach 800 ml Eluat wurde begonnen, Fraktionen zu je 100 ml zu sammeln. Proben der Fraktionen von ungefähr 1 ml wurden mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase-Enzym aus Helix pomatia gespalten [1,2] und in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert. Atractyligeninhaltige Fraktionen erhielt man zwischen 940 und 1700 ml Eluat.

Das Eindampfen und Trocknen der Eluate ergab 6,6 g atractyligeninhaltige Glykoside.

Zur weiteren Auftrennung chromatographierte man an 400 g Kieselgel(Korngröße 0,02 - 0,2 mm). Eluiert wurde mit: 1. 2 l Chloroform, 2. 2 l Chloroform versetzt mit 5 % Methanol, 3. Chloroform-Methanol-Wasser im Verhältnis von 60:35:5 [33)]. Fraktionen zu je 250 ml wurden aufgefangen.

Mit dem Laufmittel 2. eluierte man 900 mg Coffein, mit Laufmittel 3 in:

Fraktion 1	340 mg
Fraktion 2	820 mg

Fraktion	3	640 mg
Fraktion	4	330 mg
Fraktionen	5-6	460 mg

Von den Fraktionen wurden 5 - 10 mg einer enzymatischen Spaltung mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase unterworfen [1,2] und nach Veresterung mit Diazomethan in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert: Die Fraktionen 2 - 4 enthielten Atractyligenin.

Die Säulenfraktionen 2, 3 und 4 wurden an Dünnschichtplatten (20 x 20 cm, Kieselgel HR, Schichtdicke 1 mm) weiter aufgetrennt. Als Laufmittel verwendete man: Chloroform-Methanol-Wasser im Verhältnis von 60:35:5 [33].

Ein 0,5 cm breiter Streifen in der Mitte der Platten wurde mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagens besprüht [34]. Die so sichtbar gemachten Zonen wurden abgekratzt und mit Ethanol in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Zur Auffindung der atractyligeninhaltigen Fraktionen wurden wieder ungefähr 2 mg je DC-Zone enzymatisch verseift, mit Ethylacetat extrahiert, mit Diazomethan verestert und in der GC-MS-Kombination untersucht.

Säulenfraktion 2:

Die Trennung erfolgte an 6 DC-Platten, man erhielt 4 Zonen. Die Zone 2 (Rf-Wert: 0,40) enthielt 160 mg des atractyli-

geninhaltigen Glykosids KA I (7).

Säulenfraktion 3:

Die Trennung erfolgte an 5 DC-Platten, man erhielt 5 Zonen. Die Zone 3 (Rf-Wert: 0,35) enthielt 200 mg KA II (8).

Säulenfraktion 4:

Die Trennung erfolgte an 3 DC-Platten, man erhielt 5 Zonen. Die Zone 2 (Rf-Wert: 0,35) enthielt 40 mg KA II (8).

b) 5 kg-Ansatz (Arabica-Kaffee)

Der Rückstand des Methanoleluats der Amberlite XAD 2-Säule (82 g) wurde an 500 g Sephadex LH 20 chromatographiert (Elutionsmittel: Methanol). Nach 900 ml Eluat wurden Fraktionen zu je 20 ml genommen.

Von jeder 5. Fraktion unterwarf man einen kleinen Teil einer enzymatischen Spaltung [1,2] und analysierte die methylierten Spaltprodukte in der GC-MS-Kombination. Die Fraktionen 1 - 40 (900 - 1700 ml Eluat) enthielten Atractyligenin.

Zur weiteren Auftrennung der atractyligeninhaltigen Fraktionen wurde an 1,5 kg Kieselgel (Korngröße 0,02 - 0,2 mm)

chromatographiert. Als Elutionsmittel dienten: 1. 5 l Chloroform, 2. 4l Methylenchlorid versetzt mit 5 % Methanol, 3. 6 l Methylenchlorid versetzt mit 10 % Methanol, 4. 7 l Methylenchlorid + 20 % Methanol, 5. 12 l Methylenchlorid-Methanol-Wasser im Verhältnis von 65:30:5, 6. 6 l Methanol. Es wurden Fraktionen zu je 250 ml genommen.

Die Trennleistung der Säule wurde dünnschichtchromatographisch geprüft (Kieselgel, Schichtdicke: 0,25 mm, Laufmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 65:30:5, Sprühreagens Anisaldelyd-Schwefelsäure [34]) und Fraktionen mit dem gleichen Fleckenmuster vereinigt. Mit Laufmittel 5 eluierte man unter anderen 3 Fraktionen, die nach Aussage der GC-MS-Analyse der enzymatisch gespaltenen und mit Diazomethan methylierten Proben Atractyligenin (2) enthielten:

Fraktionen 30 - 36	2,5 g mit KA I (7)
Fraktionen 37 - 39	1,4 g mit KA I (7) und KA II (8) und
Fraktionen 40 - 46	2,4 g mit KA II (8)

Zur weiteren Auftrennung wurden die Säulenfraktionen 30 - 36 an 20 Dünnschichtplatten (20 x 20 cm, Kieselgel HR, Schichtdicke 1 mm, Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65:30:5) chromatographiert, indem man das Laufmittel nach dem Trocknen der Platten ein zweites Mal aufsteigen ließ. Man erhielt 7 Zonen. Aus Zone 4 (Rf-Wert: 0,65) konnten im Soxhlet mit Ethanol 590 mg KA I (7) extrahiert werden.

Die Fraktionen 37 - 39 (1,4 g) wurden an 100 g Sephadex LH 20 getrennt. Als Elutionsmittel diente Chloroform versetzt mit 25 % Methanol. Zwischen 170 und 190 ml eluierte man 510 mg mit KA I (7) als Hauptkomponente, zwischen 200 und 220 ml 570 mg mit KA II (8) als Hauptbestandteil.

Die Fraktionen 40 - 46 der Säulentrennung (2,4 g) chromatographierte man an 20 DC-Platten (20 x 20 cm, Kieselgel HR, Schichtdicke 1 mm, Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser 65:30:5. Mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens wurden 5 Zonen sichtbar. Zone 3 (Rf-Wert: 0,58) enthielt 630 mg KA II (8).

Die Wiederholung der Dünnschichtchromatographie zur weiteren Reinigung von KA I und KA II lieferte insgesamt 1160 mg KA I (7) und 1030 mg KA II (8).

Die Umkristallisation aus Methanol erbrachte 628 mg KA I (7) und 580 mg KA II (8).

III. Derivatbildung und spektroskopische Daten

KA II = 2-O-ß-D-Glucopyranosyl-atractyligenin (8)

Rf-Wert (Kieselgel, $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O 65:30:5): 0,35
Schmp.: 263 - 264°C
$[\alpha]_D^{20}$ = -79,3° ± 2, c=1; Äthanol p.a.;
Mol-Masse (Osmot. Druck): 470 ± 23;

Analyse: 482,570 $C_{25}H_{38}O_9$ gef.: C 62,15 %; H 8,00 %
ber.: C 62,22 %; H 7,94 %

FD-MS: m/e 482 (100 %, M^+); 464 (73 %, M^+-H_2O)
446 (59 %, $M^+-2\ H_2O$); 320 (61 %); 302 (57 %).

IR (KBr): 3600 - 2400 (OH und COOH), 1710 (C=O),
1635, 1655 (C=C), 1010 cm^{-1} (C-O)

H^1 - NMR ($[D_5]$ -Pyridin): δ 1,11 (3H, s, 10α-CH_3);
3,84 - 4,49 (CH - OH); 5,12 (1 H, d, J=8,5 Hz,1'-H);
5,12 und 5,40 ppm (2H, s, $C=CH_2$).

KA II - Pentaacetat = 2',3',4',6',15-Penta-O-acetyl-2-O-ß-D-glucopyranosyl-atractyligenin (8a)

50 mg KA II (8) löste man in 1 ml Pyridin, versetzte mit 1 ml Acetanhydrid und ließ über Nacht bei Zimmertemperatur stehen [12]. Nach dem Eindampfen im Stickstoffstrom trocknete man im Vakuum.

Rf-Wert (Kieselgel, Benzol + 10 % Methanol): 0,32

H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,97 (3H, s, 10α-CH_3);
1,97 (3H, s, $COCH_3$); 2,01 (6H, s, $COCH_3$);
2,04 (6H, s, $COCH_3$); 3,60 - 3,78 (1 H, m, 5'-H);
4,04 - 4,52 (4H, m, 2α-H, 15ß - H, 6'-H);
4,63 (1H, d, J= 8,5 Hz, 1'-H); 4,83 - 5,23 ppm (5H, m, 2'-H, 4'-H, 3'-H, $C=CH_2$).

KA II - Methylester = 2-O-ß-D-Glucopyranosyl-atractyligenin-methylester (8b)

50 mg KA II (8) wurden in 10 ml Methanol gelöst und mit Diazomethanlösung in Methylenchlorid bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach dem Eindampfen am Stickstoffstrom trocknete man im Vakuum [12].

Rf-Wert (Kieselgel, $CHCl_3$ - CH_3OH-H_2O; 65:30:5): 0,45

FD-MS: m/e 519 (M^++Na)

H^1-NMR ($[D_5]$ -Pyridin): δ 0,86 (3H, s, 10α-CH_3); 3,60 (3H, s, CO_2CH_3); 3,83 - 4,80 (CH - OH); 5,06 (1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H); 5,13 und 5,41 ppm (2H, s, $C=CH_2$).

KA II - Methylester-penta-acetat = 2',3', 4', 6', 15-Penta-O-acetyl-ß-D-Glucopyranosyl-atractyligeninmethylester (8c)

20 mg KA II - Methylester (8a) wurden mit 0,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reagens wurde im Stickstoffstrom verdampft und die Probe im Vakuum getrocknet [1, 12].

Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,44

H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,92 (3H, s, 10α-CH_3); 2,01; 2,03; 2,05; 2,07; 2,09 (15H, s, 5 äquatoriale $OCOCH_3$); 3,70 (3H, s, CO_2CH_3); 3,70 - 4,29 (4H, m, 2α-H, 15ß-H, 6'-H); 4,69 (1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H); 4,89 - 5,27 ppm (5H, m, 2'-H, 4'-H, 3'-H, $C=CH_2$).

Permethyl-KA II = 2', 3', 4', 6', 15-Penta-O-methyl-ß-D-glucopyranosyl-atractyligeninmethylester (8d)

23,8 mg KA II-Methylester (8b) löste man in 1 ml Dimethylformamid, versetzte mit 0,3 ml Methyljodid und 300 mg frisch gefälltem Silberoxid und rührte 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Die Mischung verdünnte man mit 50 ml Chloroform und filtrierte ab [31]. Das Eindampfen und Trocknen im Vakuum ergab 20,2 mg. Die Reinigung erfolgte an einer DC-Platte (20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Laufmittel: Benzol-Methanol 9:1);

RF-Wert: 0,44

Ausbeute: 15,2 mg (56,0 % d. Th.)

MS: m/e 566 (3 % M^+), 534 (7, $M-CH_3OH$), 331 (100), Abb. 16, Seite 48.

MS (hochaufgelöst): $C_{31}H_{50}O_9$; gef.: 566, 3446
ber.: 566, 3440

H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,86 (3H, s, 10α-CH_3); 2,80 - 330 (5H, m, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 6'-H); 3,32 (s, breit, 15ß-H); 3,37 und 3,39 (6H, s, 15α-OCH_3 und 6'-OCH_3); 3,50; 3,55; 3,60 (9H, s, 3'-, 2'-, 4'-OCH_3); 3,64 (3H, s, CO_2CH_3); 4,20 (1H, tt, J=11; 4,5 Hz, 2α-H); 4,39 (1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H); 4,80 (1H, m, 5'-H); 5,06 und 5,12 ppm (2H, s, $C=CH_2$).

Enzymatische Spaltung von KA II (8)

Spaltung mit den Enzymen aus Helix pomatia

20 mg KA II (8) wurden in 20 ml Acetatpuffer (0,5 m; pH 4,75) gelöst und, mit 0,5 ml Enzym aus Helix pomatia versetzt, 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach extrahierte man 2 mal mit je 10 ml Ethylacetat, trocknete die vereinigten Extrakte über Na_2SO_4, versetzte nach dem Abfiltrieren mit Diazomethan bis zur bleibenden Gelbfärbung und dampfte am Rotationsverdampfer ein [1,2]. Der Rückstand zeigte das MS des Atractyligeninmethylesters [2].

Die wäßrige Phase wurde mit 30 ml Methanol versetzt, über Amberlite-Amberlyst 15-Ionenaustauscher entsalzt und im Rotationsverdampfer eingedampft. Den Rückstand silylierte man mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid (5 Stunden bei 50°C) und untersuchte die Trimethylsilyläther in der GC-MS-Kombination. Die Hauptpeaks des Gaschromatogramms zeigten die Massenspektren von ß- und α-Penta-trimethylsilyl-D-glucose [36].

ß-Glucosidasespaltung

2 mg (8) in 2 ml Acetatpuffer (0,5 m; pH 4,75) wurden mit 0,5 ml ß-Glucosidase aus Süßmandeln versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach extrahierte

man mit 2 ml Ethylacetat und dampfte den Extrakt im Stickstoffstrom ein [37].

Rf-Wert (Kieselgel, Chloroform-Methanol 9:1): 0,54;

Rf-Wert (Atractyligenin): 0,54; Rf-Wert (KA II): 0,13.

Mit α-Glucosidase aus Hefe wurde KA II nicht gespalten.

Saure Spaltung von KA II (8)

5 mg (8) erwärmte man mit 10 ml 5 %iger methanolischer Salzsäure im geschlossenen Gefäß unter N_2-Atmosphäre 5 Stunden auf 90° C. Nach dem Abkühlen wurde an Amberlite-Amberlyst A 26 entsäuert und im Vakuum eingedampft [33].

Den Rückstand silylierte man mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid [12].

GC-MS: GC1 (mit steigender Retentionszeit): Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-ß-D-glucopyranosid (11c): GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-α-D-glucopyranosid (11c) [36]; GC3: 2,15 Di-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester (2b) und Produkte mit umgelagertem Gerüst.

Saure Spaltung von Permethyl-KA II (8d)

5 mg (8d) erwärmte man mit 10 ml 5 %iger methanolischer Salzsäure im geschlossenen Gefäß 5 Stunden auf 90°C [33]. Nach dem Abkühlen entsäuerte man an Amberlite-Amberlyst A 26 und dampfte im Vakuum ein.

GC-MS: (3 Hauptpeaks) GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucopyranosid (11d);(Abb.[10], Seite 39). GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranosid (11d);(Abb. 9, Seite 39)[29]; GC3: 15-O-Methyl-atractyligeninmethylester (2c) (Abb.19, Seite 55)

Hydrierung von 15-O-Methyl-atractyligeninmethylester (2c)

2 mg der sauren Spaltprodukte von Permethyl-KA II (8d) wurden in 1 ml Methanol gelöst und mit 0,5 mg Palladium-Katalysator auf Aktivkohle 5 Stunden bei Zimmertemperatur unter Normaldruck in H_2-Atmosphäre hydriert.
MS (GC-MS-Kombination): 15-O-Methyl-16-ß,17-dihydro-atractyligenin (10), m/e 350 (65 %, M^+), (Abb. 21, Seite 57).

KA I = 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-ß-D-glucopyranosid (7)

Rf-Wert (Kieselgel, $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O, 65:30:5): 0,40
Schmp.: 267° C
$[\alpha]_D^{20°}$ = - 61,5° ± 2; c=0,65; Äthanol p.a.
Mol-Masse (Osmot. Druck): 697 ± 35
Analyse: 728, 829; $C_{36}H_{56}O_{15}$; gef.: C 59,19 % H 7,66 %
ber.: C 59,32 % H 7,74 %
FD-MS: m/e 751 (M^++Na); Molekulargewicht: 728
IR (KBr): 3300 - 2400 (OH und COOH); 3030, 1655, 1635 (C=CH_2); 1735 (CO-O-C); 1715 (COOH); 1070, 1030, 1010 cm^{-1}(C-O-H

H^1-NMR ($[D_5]$ -Pyridin): δ 1,02 (6H, dd, J=7 Hz; 1,5 Hz, $CH(CH_3)_2$); 1,07 (3H, s, 10α-CH_3); 3,60 - 4,80 (m, C<u>H</u>-OH); 4,90 und 5,07 (je 1H, d, J=8,5 Hz, 1'- und 1"-H); 5,11 und 5,41 (je 1H, s, $C=CH_2$); 5,54 ppm (1H, m, 2'-H)

KA I a (<u>9</u>)und Isovaleriansäure

KA I a = 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-ß-D-glucopyranosid (<u>9</u>)

100 mg KA I (<u>7</u>) wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 5 ml 1n NaOH versetzt. Die Mischung ließ man über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und neutralisierte danach an einem Amberlite-Amberlyst 15-Kationenaustauscher. Nach dem Verdünnen mit 30 ml Wasser extrahierte man zweimal mit je 20 ml Diethyläther, trocknete über Natriumsulfat und dampfte auf dem Wasserbad ein: 14 mg Isovaleriansäure.
MS: m/e 102 (0,8 % M^+); 87 (16); 74 (9); 69 (3); 61 (6); 60 (100); 59 (2); 57(5); 56 (2); 55 (2); 45 (18); 43 (32); 42 (10), 41 (35).
IR (KBr-Film): 3600-2200 (CO_2H); 1710 (C=O); 1645, 1410 (CH_2, CH_3); 1370, 1385 ($CH(CH_3)_2$); 1300 cm^{-1}(C-O).

1 mg des Rückstands versetzte man bis zur bleibenden Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethanlösung [12] und dampfte im Stickstoffstrom ein: Isovaleriansäuremethylester.
MS: m/e 116 (2 %, M^+); 102 (2); 101 (31); 88 (20); 86 (2);

85 (57); 75 (7); 74 (100); 73 (5); 69 (12); 60 (1); 59 (45); 58 (2); 57 (58); 56 (10); 55 (6); 45 (2); 44 (3); 43 (59); 42 (9); 41(53); 40 (2); 39 (22); 31 (26); 29 (35).

Die wäßrige Phase dampfte man am Rotationsverdampfer ein:
80 mg KA I a (9);
Rf-Wert (Kieselgel, $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O 65:30:5): 0,30;
FD-MS: m/e 667 (M^++Na); MG 644;
H^1-NMR ($[D_5]$ -Pyridin): δ 1,14 (10α-CH_3); 3,57 - 5,03 (m, C-H-O-); 5,08 und 5,13 (je 1H, d, J=8,5 Hz, 1'- und 1"-H); 5,15 und 5,44 ppm (je 1H, s, C=CH_2).

KA I a-Peracetat = 2', 4', 6', 2", 3", 4", 6"-Octa-O-acetyl-3'-ß-D-glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-glucopyranosid (9a)

20 mg KA I a (9) wurden in 1 ml Pyridin gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid versetzt über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reagens verdampfte man im Stickstoffstrom und trocknete dann im Vakuum [12]. Die Reinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Benzol-Methanol 9:1).
Rf-Wert: 0,32
H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,98 (3H, s, 10α-CH_3); 1,94; 1,98; 2,02; 2,05; 2,09 (24H, s, $COCH_3$); 3,60 - 3,80 (2H, m, 5'-H und 5"-H); 3,87 - 4,36 (5H, m, 6'-H, 6"-H und 2α-H); 4,50 und

4,59 (je 1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H und 1"-H); 4,79 - 5,26 ppm (9H, m, 2'-H, 2"-H, 3'-H, 3"-H, 4'-H, 4"-H, 15ß-H und $C=CH_2$).

KA I a-Methylester = 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin-methylester)-ß-D-glucopyranosid (9b)

40 mg KA I (9) wurden in 2 ml Methanol gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung behandelt [12]. Man dampfte im Stickstoffstrom ein und chromatographierte an Kieselgelplatten ($CHCl_3$ - CH_3OH - H_2O 65:30:5): 30 mg.

Rf-Wert: 0,34;

H^1-NMR ($[D_5]$ -Pyridin): δ 0,85 (3H, s, 10α-CH_3); 3,61 (3H, s, CO_2CH_3); 3,92 - 5,24 (CH - OH); 5,14 und 5,43 ppm (je 1H, s, $C=CH_2$).

KA I a-Methylester-Peracetat = 2', 4', 6', 2", 3", 4", 6", 15-Octa-O-acetyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2-ß-(2-desoxy-atractyligenin-methylester)-ß-D-glucopyranosid (9c)

20 mg KA I a-Methylester (9b) wurden wie KA II mit Acetanhydrid/Pyridin behandelt [12].

Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,42

H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,87 (3H, s, 10α-CH_3); 1,97; 1,99; 2,01; 2,04; 2,06; 2,10 (24H, s, $COCH_3$); 3,60 - 3,80 (2H, m, 5'-H und 5"-H); 3,65 (3H, s, CO_2CH_3); 3,88 - 4,20 (5H, m, 6'-H,

6"-H und 2α-H); 4,50 und 4,58 (je 1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H und 1"-H); 4,78 - 5,25 ppm (9H, m, 2'-H, 2"-H, 3'-H, 3"-H, 4'-H, 4"-H, $C=CH_2$).

Permethyl-KA I a = 2', 4', 6', 2", 3", 4", 6", 15-Octa-O-methyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin-methylester)-ß-D-glucopyranosid (9d)

20 mg (9b) wurden mit CH_3J/Ag_2O zum Permethylderivat - wie bei KA II beschrieben - umgesetzt. Ausbeute(nach präparativer DC): 14 mg

Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,47

MS: m/e 770 (0,1 %, M^+), Abb. 17, Seite 50

Hochaufgelöst: $C_{40}H_{66}O_{14}$: gef.: 770, 4454

ber.: 770, 4452

H^1-NMR ($CDCl_3$); δ 0,87 (3H, s, 10α-CH_3); 2,80 - 3,24 (m, CHOH); 3,37 (3H, s, 15α-OCH_3); 3,40 (6H, s, 6'-OCH_3 und 6"-OCH_3); 3,51; 3,56; 3,58; 3,61 (12H, s, OCH_3); 3,64 (3H, s, CO_2CH_3); 4,40 und 4,69 (je 1H, d, J=8 Hz, 1'-H und 1"-H); 5,06 und 5,11 ppm (je 1H, s, $C=CH_2$).

Saure Spaltung von Permethyl-KA I a (9d)

5 mg (9d) wurden mit methanolischer Salzsäure, wie bei der Spaltung von Permethyl-KA II (8d) beschrieben, behandelt:

GC (GC-MS-Kombination): 4 Hauptpeaks, GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucopyranosid (11d); GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranosid (11d); GC3: Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e); GC4: 15-O-Methyl-atractyligenin-methylester (2c).

1 mg der Solvolysenprodukte wurde mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) 5 Stunden bei 50° C silyliert.
GC (GC-MS-Kombination): GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucopyranosid (11d); GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranosid (11d); GC3: Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-3-O-trimethylsilyl-ß-D-glucopyranosid (11f); GC4: Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-3-O-trimethylsilyl-α-D-glucopyranosid (11f); GC5: 15-O-Methyl-2-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester (2d).

Enzymatische Spaltung von KA I a (9)

Enzyme aus Helix pomatia

5 mg 9 wurden in 5 ml Acetatpuffer (0,5 m, pH 4,75) gelöst, mit 0,1 ml Arylsulfatase/ß-Glucuronidase (Rohenzyme aus Helix pomatia) versetzt und 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach extrahierte man mit 20 ml Ethylacetat, trocknete über Natriumsulfat und dampfte ein. Den Rück-

stand löste man in 0,5 ml Methanol, versetzte bis zur bleibenden Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethanlösung und dampfte im Stickstoffstrom ein.
MS (GC-MS-Kombination): m/e 334 (M^+) identisch mit dem MS des Atractyligeninmethylesters (2) [2].

Die wäßrige Phase wurde mit 20 ml Methanol verdünnt, an Amberlite-Amberlyst 15 entsalzt und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand silylierte man mit MSTFA.
GC-MS: 2 Hauptpeaks, pertrimethylsilylierte α- und ß-D-Glucose, MS identisch mit Lit-MS [36].

ß-Glucosidase

2 mg KA I a (9) wurden mit ß-Glucosidase, wie bei KA II (8) beschrieben, behandelt.
Rf-Wert (Kieselgel, Chloroform-Methanol 9:1): 0,54
Rf (Atractyligenin): 0,54
(9) ließ sich mit α-Glucosidase nicht spalten.

KA I-Peracetat = 4', 6', 2", 3", 4", 6", 15-Hepta-O-acetyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligenin)-ß-D-glucopyranosid (7a)

20 mg KA I wurden mit 0,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid über Nacht stehen gelassen und im Stickstoffstrom eingedampft. Zur Reinigung trennte man an Kieselgeldünn-

schichtplatten. Ausbeute 16 mg;

Rf-Wert (Benzol-Methanol 9:1): 0,30

H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,98 (3H, s, 10α-CH_3); 1,02 (6H, d, J= 7 Hz, $CH(CH_3)_2$); 1,96; 1,99; 2,03; 2,06; (21H, s, $COCH_3$); 3,58 - 3,84(2H, m, 5'-H und 5"-H); 3,90 - 4,41 (5H, m, 6'-H, 6"-H und 2α-H); 4,53 und 4,55 (je 1H, d, J= 8,5 Hz, 1'-H und 1"-H); 4,80 - 5,24 ppm (9H, m, 2'-H, 2"-H, 3'-H, 3"-H, 4'-H, 4"-H, 15ß-H und $C=CH_2$).

KA I-Methylester = 3'-O-ß-D-Glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethylester)-ß-D-glucopyranosid (7b)

50 mg KA I (7) löste man in 10 ml Methanol und behandelte mit ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung. Danach wurde im Stickstoffstrom eingedampft und zur Reinigung an Kieselgeldünnschichtplatten chromatographiert. Ausbeute 42 mg;

Rf-Wert ($CHCl_3$ - CH_3OH - H_2O 65:30:5): 0,46

H^1-NMR ($[D_5]$ -Pyridin); δ 0,88 (3H, s, 10α-CH_3); 0,99 (6H, dd, J=7 Hz; 1,5 Hz, $CH(CH_3)_2$); 3,59 (3H, s, CO_2CH_3); 3,65 - 4,60 (CHOH); 4,83 und 4,95 (je 1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H und 1"-H); 5,09 und 5,35 (je 1H, s, $C=CH_2$); 5,45 ppm (1H, m, 2'-H).

KA I-Methylester-peracetat = 4', 6', 2", 3", 4", 6", 15-Hepta-O-acetyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethylester)-ß-D-glucopyranosid (7c)

20 mg KA I-Methylester (7b) wurden wie beschrieben mit Pyridin-Acetanhydrid acetyliert und durch DC gereinigt.
Ausbeute: 17 mg;
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,45
H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,87 (3H, s, 10α-CH_3); 1,02 (6H, d, J=7 Hz, $CH(CH_3)_2$); 1,96; 2,00; 2,03; 2,05; 2,07 (21H, s, $COCH_3$); 3,66 (3H, s, CO_2CH_3); 3,58 - 3,84 (2H, m, 5'-H und 5"-H); 3,89 - 4,41 (5H, m, 6'-H, 6"-H und 2α-H); 4,53 und 4,55 (je 1H, d, J=8,5 Hz, 1'-H und 1"-H); 4,73 - 5,29 ppm (9H, m, 2'-H, 2"-H, 3'-H, 3"-H, 4'-H, 4"-H, 15ß-H und $C=CH_2$).

Permethyl-KA I = 4', 6', 2", 3", 4", 6", 15-Hepta-O-methyl-3'-O-ß-D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleroyl-2ß-(2-desoxy-atractyligeninmethylester)-ß-D-glucopyranosid (7d)

20 mg KA I-Methylester (7b) wurden wie bei KA II beschrieben, mit Methyljodid und Silberoxid permethyliert. Die Reinigung von Permethyl-KA I erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie. Ausbeute 13 mg;
Rf-Wert (Benzol-Methanol 9:1): 0,45

MS = m/e 840 (0,8 %, M^+) Abb. 18, Seite 52

Hochaufgelöst: $C_{44}H_{72}O_{15}$ gef.: 840, 4879

ber.: 840, 4870

H^1-NMR ($CDCl_3$): δ 0,85 (3H, s, 10α-CH_3); 0,97 (6H, d, J= 7 Hz, $CH(CH_3)_2$); 3,10 (1H, s, 15ß-H); 3,38; 3,40; 3,43; 3,51; 3,57 (s, 7 OCH_3); 3,63 (3H, s, CO_2CH_3); 2,80 - 3,80 (CH-O); 4,36 und 4,42 (je 1H, d, J = 8,5 Hz, 1' und 1"-H); 4,87 (1H, m, 2'-H); 5,05 und 5,13 ppm (je 1H, s, $C=CH_2$).

Saure Spaltung von Permethyl-KA I (7d)

5 mg Permethyl-KA I wurden, wie bei Permethyl-KA II beschrieben, einer sauren Spaltung unterworfen.
GC-MS: 4 Hauptpeaks; GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucopyranosid (11d); GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-Methyl-α-D-glucopyranosid (11d); GC3: Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g); GC4: 15-O-Methyl-atractyligeninmethylester (2c).

2 mg der sauren Spaltprodukte wurden mit MSTFA trimethylsilyliert.
GC-MS: GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucopyranosid (11d); GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranosid (11d); GC3: Methyl-4,6-di-O-methyl-2,3,-di-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosid (11h); GC4: 15-O-Methyl-2-O-trimethylsilyl-atractyligeninmethylester (2d).

Saure Spaltung von KA I (7)

5 mg 7 erwärmte man mit 10 ml 5 %iger methanolischer Salzsäure 5 Stunden auf 90° C [33]. Nach dem Abkühlen wurde an Amberlite-Amberlyst A 26-Ionenaustauscher entsäuert und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand silylierte man mit MSTFA.
GC-MS: GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-ß-D-glucopyranosid (11b); GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-α-D-glucopyranosid (11b); GC3: 2,15-di-O-Trimethylsilyl-atractyligenin-methylester (2b) und weitere Verbindungen mit Gerüstumlagerungen.

Enzymatische Spaltung von KA I (7)

Enzyme aus Helix pomatia

5 mg 7 wurden, wie bei KA I a (9) beschrieben, mit Arylsulfatase/Glucuronidase (Rohenzyme aus Helix pomatia), gespalten. Die GC-MS-Analyse lieferte das gleiche Ergebnis wie bei KA I a. Die auch entstandene Isovaleriansäure konnte nicht nachgewiesen werden, da sie beim Eindampfen mit dem Lösungsmittel entweicht.

ß-Glucosidase -Spaltung

2 mg 7 wurden mit ß-Glucosidase, wie bei KA II (8) beschrie-

ben, behandelt.

Rf-Wert (Kieselgel, Chloroform-Methanol 9:1): 0,54;

Rf-Wert (Atractyligenin): 0,54

KA I (7) ließ sich mit α-Glucosidase nicht spalten.

IV. Darstellung der Vergleichsverbindungen

1. Penta-O-trimethylsilyl-glucose (11b)

0,1 mg Glucose (11) versetzte man mit 100 ml MSTFA und erhitzte im geschlossenen Röhrchen eine Stunde auf 50° C. Die Reaktionslösung wurde dann direkt auf die Säule des Gaschromatographen der GC-MS-Kombination gespritzt. MS identisch mit Lit. MS [36] und identisch mit dem MS des Hauptpeaks des Gaschromatogramms, der trimethylsilylierten wasserlöslichen enzymatischen Spaltprodukte von KA I (7) und KA II (8).

2. Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosid (11c)

1 mg Glucose (11) erhitzte man mit 5 ml 5 %iger methanolischer Salzsäure 5 Stunden im geschlossenen Gefäß auf 90° C. Nach dem Abkühlen entsäuerte man am Amberlite-Amberlyst A 26-Ionenaustauscher und dampfte im Vakuum ein. Den Rückstand versetzte man mit 100 µl MSTFA und ließ die Lösung 1 Stunde bei 50° C stehen. Die Mischung wurde direkt

auf die Säule der GC-MS-Kombination gespritzt.
GC: 2 Peaks; α und ß-Methyl-2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-D-glucopyranosid (11c)
MS: Die Massenspektren sind identisch mit denen, die D. C. DeJongh et al. [36] publiziert haben.

3. Oktamethylcellobiose (12a)

100 mg Cellobiose (12) wurden in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit 5 ml Dimethylformamid verdünnt und mit 1,7 g Bariumoxid sowie 1,7 g $Ba(OH)_2 \cdot 8\ H_2O$ bei 0° C gerührt. In die Mischung tropfte man unter Rühren 3,5 ml Dimethylsulfat unter Stickstoffatmosphäre zu. Man rührte über Nacht bei Zimmertemperatur weiter und zersetzte dann überschüssiges Dimethylsulfat durch Zugabe von 3 ml konz. Ammoniaklösung. Nach 20 Min. weiterem Rühren schlämmte man die Mischung in 100 ml Chloroform auf, filtrierte die überstehende Lösung ab und dampfte im Vakuum ein [38].
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Äthanol 5:1): 0,72 (ß-Oktamethylcellobiose); 0,59 (α-Oktamethylcellobiose). Bei der präparativen Dünnschichtchromatographie erhielt man das ß-Isomere kristallin; Ausbeute 40 mg.
Schmp.: 86° C; MS: m/e 380 (7%, M-74) identisch mit Lit-MS [39]

Saure Spaltung von ß-Oktamethylcellobiose (12a)

5 mg in 10 ml 5 %iger methanolischer Salzsäure gelöst

wurden 5 Stunden im geschlossenen Gefäß auf 90° C erwärmt. Danach entsäuerte man an Amberlite-Amberlyst A-21 und dampfte im Vakuum ein.
GC-MS: GC1: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-ß-D-glucopyranosid (11d); GC2: Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranosid (11d); GC3: Methyl-2,3,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11i)

4. Darstellung von Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid [31]

Diacetonglucose = 1,2 : 5,6-Di-O-isopropyliden-D-glucofuranose (13)

10 g Glucosemonohydrat wurden in 500 ml Aceton aufgeschlämmt, mit 2 ml konz. Perchlorsäure und 10 g Natriumsulfat versetzt. Die Mischung rührte man 3 Tage bei Zimmertemperatur und filtrierte dann ab. Das Filtrat dampfte man am Rotationsverdampfer ein. Der Rückstand wurde aus Aceton umkristallisiert, das Kristallisat mit Wasser gewaschen, Ausbeute 6 g (40 % d. Theorie);
Schmp.: 105 - 109° C; MS: identisch mit Literatur-MS [40].

3-O-Benzyl-diacetonglucose (13a)

2 g Diacetonglucose (13) löste man in 15 ml Dimethylform-

amid, versetzte mit 3 ml Benzylbromid sowie 4 g Silberoxid und rührte die Mischung über Nacht. Danach setzte man 10 ml Pyridin zur Zerstörung des überschüssigen Benzylbromids zu, verdünnte mit 50 ml Chloroform, filtrierte die Silbersalze ab und dampfte ein [31]: 2,4 g (89 % d. Theorie);
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,89; MS: m/e 335 (3%, M^+-CH_3), 292 (3, M^+-Aceton); 91 (100).

Methyl-3-O-benzyl-α,ß-D-glucopyranosid (11j)

1,2 g 13a wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 3 ml 37 %iger Salzsäure versetzt 4 Stunden im geschlossenen Gefäß auf 80° C erhitzt [31]. Nach dem Abkühlen entsäuerte man an Amberlite-Amberlyst A-21-Ionenaustauscher und dampfte ein: 0,9 g (92 % d. Theorie).
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,20

Methyl-3-O-benzyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11k)

0,8 g Methyl-3-O-benzyl-α,ß-D-glucopyranosid (11j) löste man in 25 ml Dimethylsulfoxid und 25 ml Dimethylformamid, fügte 8 g Bariumoxid und 8 g $Ba(OH)_2 \cdot 8\ H_2O$ zu und tropfte unter Rühren bei 0° C 17 ml Dimethylsulfat zu. Über Nacht wurde bei Zimmertemperatur weiter gerührt. Zur Zerstörung des überschüssigen Dimethylsulfats tropfte man 10 ml konz.

Ammoniaklösung zu und rührte weitere 20 Min. Die Reaktionsmischung wurde dann in 150 ml Chloroform aufgeschlämmt und die überstehende Lösung abfiltriert, mit 3 mal 30 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet [38]. Eindampfen im Vakuum ergab 0,6 g Öl (65 % d. Theorie)
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,83

Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e)

500 mg Methyl-3-O-benzyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11k) wurden in 10 ml Eisessig gelöst und mit 50 mg Palladium-Aktivkohle-Katalysator 5 Stunden bei Zimmertemperatur unter 5 at H_2-Druck hydriert [41]. Nach dem Abfiltrieren vom Katalysator und Eindampfen im Vakuum wurden 340 mg (94 % d. Theorie) Öl erhalten.
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,59 (ß); 0,51 (α)
GC: 1 Peak (Epimere trennten nicht) Retentionszeit und Massenspektrum sind identisch mit der Retentionszeit und dem MS von 11e (Abb. 11, Seite 40) aus Permethyl-KA I a (9d)

Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-3-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosid (11f)

0,1 mg Methyl-2,4,6-tri-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11e) erwärmte man mit 10 µl MSTFA im zugeschmolzenen Röhrchen 2 Stunden auf 50° C und brachte die Lösung direkt

auf die Trennsäule des Gaschromatographen der GC-MS-Kombination [12].

GC: 2 Peaks; Retentionszeiten identisch mit den silylierten Spaltprodukten 11f aus Permethyl-KA I a (7).

MS: identisch mit den MS der silylierten Spaltprodukte von Permethyl-KA I a (7), Abb. 14, Seite 45.

5. Darstellung von Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g) [30]

Methyl-α-D-glucopyranosid (11a)

100 g D-Glucose (11) wurden mit 500 ml 2 %iger methanolischer Salzsäure 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt [43]. Danach dampfte man im Vakuum ein und kristallisierte aus Methanol um. Das Kristallisat wurde mit Äther gewaschen: Ausbeute 25 g (23 % d. Theorie bez. auf ß und α-Prod.). Schmp.: 162° C, Literatur-Schmp.: 166° C [42].

Methyl-4,6-O-benzyliden-α,D-glucopyranosid (11l)

12 g α-Methylglucosid, 9 g feingepulvertes Zinkchlorid und 35 ml Benzaldehyd wurden 3 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt [43]. Danach verdünnte man mit 50 ml Wasser und saugte den Niederschlag ab. Auf der Nutsche wurde mit

Wasser, dann mit Cyclohexan gewaschen. Umkristallisation aus Wasser ergab 9 g Produkt (52 % d. Theorie).
Schmp.: 162° C, Literatur-Schmp.: 161 - 162° C [43].

Methyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-α-D-glucopyranosid (11m)

2 g Methyl-4,6-O-benzyliden-α,D-glucopyranosid (11l) löste man in 30 ml Dimethylformamid und rührte über Nacht mit 8 ml Benzylbromid und 8 g Silberoxid. Nach Zugabe von 10 ml Pyridin wurde mit 100 ml Methylenchlorid verdünnt, die Silbersalze abfiltriert und im Vakuum eingedampft [31]:
3,1 g (81 % d. Theorie). Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,52.

Methyl-2,3-di-O-benzyl-α,ß-D-glucopyranosid (11n)

2 g Methyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-α,ß-D-glucopyranosid (11m) wurden in 50 ml Methanol gelöst, mit 3 ml konz. Salzsäure versetzt, 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt [44]. Nach dem Abkühlen entsäuerte man an Amberlite-Amberlyst A-21 und dampfte im Vakuum ein. Nach dem Trocknen im Vakuumtrockenschrank (10^{-3} Torr; 50°C) erhielt man 1,1 g (67 % d. Theorie).
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,09

Methyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g)

1 g Methyl-2,3-di-O-benzyl-α,ß-D-glucopyranosid, in 15 ml Dimethylsulfoxid und 15 ml Dimethylformamid gelöst, versetzte man mit 7 g Bariumoxid und 7 g $Ba(OH)_2 \cdot 8\ H_2O$ und tropfte unter Rühren bei 0° C 15 ml Dimethylsulfat zu. Bei Zimmertemperatur wurde über Nacht weiter gerührt. Das überschüssige Dimethylsulfat zersetzte man mit 10 ml konz. Ammoniak und rührte weitere 20 Min [35]. Die Mischung wurde in 100 ml Chloroform aufgeschlämmt, die überstehende Lösung abfiltriert und 3 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft und getrocknet: 0,8 g (74 % d. Theorie).
Rf-Wert (Kieselgel, Benzol-Methanol 9:1): 0,43

Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid (11g)

500 mg Methyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid wurden in 10 ml Ethylacetat gelöst und mit 200mg Palladium-Aktivkohle unter 5 at H_2 5 Stunden bei Zimmertemperatur hydriert [41]. Abfiltrieren und Eindampfen im Vakuum ergab 270 mg (98 % d. Theorie).
Rf-Wert (Benzol-Methanol 9:1): 0,13
MS: Abb. 13, Seite 43, identisch mit dem MS des Spaltproduktes von 7d.

Methyl-4,6-di-O-methyl-2,3-di-O-trimethylsilyl-α,ß-D-glucopyranosid (11h)

1 mg Methyl-4,6-di-O-methyl-α,ß-D-glucopyranosid wurde mit 10 µl MSTFA im geschlossenen Röhrchen 2 Stunden auf 50° C erwärmt. Die Lösung spritzte man auf die Trennsäule des Gaschromatographen [12].

GC: 1 Peak, Retentionszeit identisch mit 11h aus Permethyl-KA I (7d). MS: Abb. 15, Seite 46, identisch mit dem MS des trimethylsilylierten Spaltproduktes aus Permethyl-KA I (7d).

LITERATURVERZEICHNIS

1) H. Obermann, G. Spiteller und G. A. Hoyer,
Chem. Ber. 106, 3506 (1973)

2) H. Ludwig, H. Obermann und G. Spiteller,
Chem. Ber. 107, 2409 (1974)

3) M. Lefrane,
J. Pharm. Chim. 4, (9), 81 (1869)

4) T. Ajello, F. Piozzi, A. Quilico und V. Sprio,
Gazz. Chim. Ital. 93, 867 (1963)

5) F. Piozzi, A. Quilico, R. Mondelli, T. Ajello,
V. Sprio und A. Melera,
Tetrahedron 22, 515 (1966)

6) F. Piozzi, A. Quilico, C. Fuganti, T. Ajello
und V. Sprio,
Gazz. Chim. Ital. 97, 935 (1967)

7) M. Klingenberg, K. Grebe und H. W. Heldt,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 344 (1970)

8) P. V. Vignais, E. D. Duee, P. M. Vignais und J. Huet,
Biochem. Biophys. Acta 118, 465 (1966)

9) H. W. Heldt,
Angew. Chem. 84, 792 (1972)

10) M. Hammoniere, A. Dueruix, C. Pascard und J. Poisson,
7. Internationales Kolloquium über Kaffee, Hamburg,
9. - 14. Juni 1975, im Druck

11) F. Chassevent, M. D'Ornano und S. Pougeneaud,
3. Internationales Kolloquium über Kaffee-Chemie
(Triest, 2. - 9. Juni 1967), ASIC Paris, S. 175 - 182

12) H. Obermann und G. Spiteller,
Chem. Ber. 108, 1093 (1975)

13) K. H. Slotta und K. Neisser,
Chem. Ber. 71, 1991 und 2342 (1938)

14) A. Wettstein, F. Hunziker und K. Miescher,
Helv. Chim. Acta 26, 1197 (1955)

15) C. Djerassi, M. Cais und L. A. Mitscher,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 2386 (158)

16) R. A. Finnegan,
J. Amer. Chem. Soc. 83, 3o57 (1961)

17) H. P. Kaufmann und A. K. Sen Gupta,
Fette, Seifen, Anstrichmittel 65, 529 (1963)

18) H. P. Kaufmann und A. K. Sen Gupta,
Chem. Ber. 96, 2489 (1963)

19) H. Richter und G. Spiteller,
unveröffentlicht

20) R. Tschesche, A. Harz und J. Petričić,
Chem. Ber. 107, 53 (1974)

21) R. Tschesche und H. Gutwinski,
Chem. Ber. 108, 265 (1975)

22) O. G. Vitzthum in O. Eichler,
Kaffee und Coffein, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1975)

23) H. L. Bradlow,
Steroids 11, 265 (1968)

24) D. Horton und J. H. Lauterbach,
Carbohyd. Res. 43, 9 (1975)

25) A. C. Richardson und K. A. McLauchlan,
J. Chem. Soc. 1962, 2499

26) G. Remberg, E. Remberg, M. Spiteller-Friedmann
und G. Spiteller,
OMS 1, 87 (1968)

27) H. D. Beckey,
Angew. Chem. 81, 662 (1969)

28) H. Adlerkreutz, B. Soltmann und M. J. Tikkanen,
J. Steroid Biochemistry 5, 163 (1974)

29) N. K. Kochetkov, N. S. Wulfson, O. S. Chizhov
und B. M. Zolotarev,
Tetrahedron 19, 2209 (1963)

30) F. Micheel,
Chemie der Zucker und Polysaccharide, 2. Aufl.,
Seite 437, Akademische Verlagsgesellschaft Geest
und Portig, Leipzig 1956

31) R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann,
Chem. Ber. 89, 203 (1957)

32) D. J. Bell und J. Lorber,
J. Chem. Soc. 1940, 453

33) R. Tschesche, A. M. Javellana und G. Wulff,
Chem. Ber. 107, 2828 (1974)

34) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-
Chromatographie, Seite 7, E. Merck, Darmstadt 1970

35) K. Wallenfels, G. Bechtler, R. Kuhn, H. Trischmann und H. Egge,
Angew. Chem. 75, 1014 (1963)

36) D. C. DeJongh, T. Radford, J. D. Hribar, S. Hanessian, M. Bieber, G. Dawson und C. C. Sweely,
J. Amer. Chem. Soc. 91, 1728 (1969)

37) H. Pipperger und K. Seifert,
Tetrahedron 31, 1561 (1975)

38) R. Kuhn und H. Trischmann,
Chem. Ber. 96, 284 (1963)

39) O. S. Chizhov, L. A. Polyakova und N. K. Kochetkov,
Dokl. Akad. Nauk SSSR. 158, 685 (1964)

40) D. C. DeJongh und K. Biemann,
J. Amer. Chem. Soc. 86, 67 (1964)

41) E. E. Combs, C. M. McCloskey, R. L. Sundberg und G. H. Coleman,
J. Amer. Chem. Soc. 71, 276 (1949)

42) Fieser und Fieser,
Organische Chemie, 2. Aufl., Seite 1149, Verlag Chemie, Weinheim 1968

43) K. Freudenberg, H. Toepffer und C. C. Andersen,
Chem. Ber. 61, 1750 (1928)

44) K. Freudenberg und E. Plankenhorn,
Chem. Ber. 73, 621 (1940)

Herrn Dr. O. Vitzthum, Kaffee Hag, bin ich für die Unterstützung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Rapp, Varian MAT, danke ich für die Aufnahme der FD-Massenspektren.

Für die Messung der hochaufgelösten Massenspektren danke ich den Herren Dr. G. Remberg und Dr. M. Ende, Herrn Leonhardt und Fräulein Oberländer für die Messung der NMR-Spektren und für die Bestimmung der Molmassen, Herrn M. Beller für die Ausführung der C-H-Analysen.

Bei meinen Kollegen bedanke ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 10. 5. 1945 wurde ich in Rosdorf-Rischenkrug bei Göttingen als zweiter Sohn des Gast- und Landwirts Albert Obermann und seiner Ehefrau Hermine, geb. Hühne geboren.
Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Rosdorf-Settmarshausen, anschließend die Gerhart-Hauptmann-Mittelschule in Göttingen. Das Abschlußzeugnis der Mittelschule erhielt ich Ostern 1962.

Von 1962 bis 1965 lernte ich bei der Penicillin-Gesellschaft Dauelsberg & Co Chemielaborant. Während der Lehre besuchte ich die Gewerbeschule Göttingen. 1965 erhielt ich den Gehilfenbrief.
Vom 4. 10. 1965 bis 30. 5. 1967 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Niedersächsischen Landespolizei ab.

Seit dem 1. 6. 1967 bin ich als Chemielaborant im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen beschäftigt.
Am 16. 4. 1970 bestand ich die Prüfung für die Zulassung zum Hochschulstudium ohne Reifezeugnis. Seit dem 20. 4. 1970 studiere ich Chemie an der Universität Göttingen. Im April 1973 bestand ich die Diplom-Chemiker-Vorprüfung und fertigte anschließend unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Spiteller im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen meine Diplom-Arbeit mit dem Thema "Isolierung von Diterpencarbonsäuren aus

Kaffeebohnen" an.

Im Juni 1974 legte ich die Diplom-Prüfung für Chemiker ab. Die vorliegende Arbeit begann ich im August 1974.

Seit 1965 bin ich mit Heide-Lore Obermann, geb. Hornberger verheiratet, wir haben drei Kinder.